



PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UESC - PROIC 2012/2013

FORMULÁRIO 3

Projeto de Pesquisa do Orientador e Plano de Trabalho do Discente

Projeto de Pesquisa

INFORMAÇÕES GERAIS DO PROJETO

Título do Projeto: "Manutenção do potencial evolutivo de *Eschweilera ovata* (Lecythidaceae) no Minicorredor Conduro – Boa Esperança do Sul da Bahia."

Financiamento: (X) sim () não

Agência: CAPES/MCT, FAPESB e UESC

Envolverá pesquisa com Humanos, Animais ou OGMs (*Organismos Geneticamente Modificados*)? () sim (X) não

Nº do protocolo ou do processo no respectivo Comitê:

Dados do(s) discente(s) candidato(s) à bolsa

1. Nome: Alessandro Souza Santos

Matrícula: 200911064

Curso: Ciências Biológicas Bacharelado

Ingresso por ações afirmativas: (X) sim () não

2. Nome: José Vicente Pires Neto

Matrícula: 200911072

Curso: Agronomia

Ingresso por ações afirmativas: () sim (X) não

RESUMO

A Mata Atlântica encontra-se altamente fragmentada com menos de 12% de sua área original. A destruição e fragmentação de habitats representam uma das maiores ameaças para a conservação da biodiversidade, uma vez que reduz o número de indivíduos e populações, altera ciclos biogeoquímicos e, principalmente, reduz o potencial evolutivo das populações. Dessa forma, tornando-as ainda mais suscetíveis aos processos de seleção, deriva genética e endogamia, acelerando o processo de extinção de espécies. Contudo, nesse cenário fragmentado, o sul da Bahia apresenta a maior biodiversidade de espécies arbóreas do globo. Essa diversidade vem se mantendo devido a uma matriz teoricamente permeável cuja paisagem é composta pelas *cabruças* (plantação de cacau sombreada por árvores nativas), fragmentos florestais e outras formas de uso da terra. Visando auxiliar na manutenção do potencial evolutivo de espécies arbóreas, este trabalho propõe

avaliar através do uso de marcadores microssatélites nucleares (SSR) e cloroplastidiais (cpSSR), o fluxo gênico histórico entre e dentro de populações de uma espécie arbórea que apresenta alto potencial de regeneração em áreas degradadas: *Eschweilera ovata* (Lecythidaceae), popularmente conhecido como biriba. Com o conhecimento do potencial evolutivo de *E. ovata* mantida em unidades de conservação no Minicorredor Conduro – Boa Esperança, ao final do projeto será possível delinear estratégias de conservação e restauração para a presente espécie, que poderão ser extrapolados para o restante das Unidades de Conservação do Corredor Central de Mata Atlântica da Bahia.

Palavras Chave (máximo 4): Árvore; Unidade de Conservação; Genética; Marcadores Moleculares.

DADOS COMPLEMENTARES DO PROJETO

Justificativa: *Situar o assunto e justificar a relevância do problema abordado, evidenciando como os resultados previstos pelo projeto justificam sua execução.*

A diversidade genética assegura a populações o potencial evolutivo para contrapor os efeitos gerados por estresse ambiental, poluição e doenças. O potencial evolutivo é medido diretamente através da variação quantitativa para a aptidão reprodutiva. Contudo, medidas de caracteres quantitativos em seres vivos com longo ciclo de vida, como espécies arbóreas tropicais, tornam-se inviável, principalmente quando as informações têm que ser obtidas rapidamente para estratégias de conservação (REED, 2005). Marcadores moleculares podem ser alternativas para mensurar o potencial evolutivo de uma espécie. Logo, o potencial evolutivo de uma espécie pode ser mensurado através da diversidade genética (heterozigosidade observada e esperada) de uma amostra aleatória de locos no genoma (FRAKHAM *et al.*, 2009).

Na biologia da conservação existe uma constante preocupação em observar a variação da diversidade genética ao longo do tempo. Pois, uma redução na diversidade genética de uma população pode significar endogamia e a perda do potencial evolutivo. Para reter o potencial evolutivo há a necessidade de manter uma população mínima viável (PMV). A PMV depende da densidade de indivíduos e do tamanho efetivo da população. Quanto menor a endogamia e parentesco dos indivíduos numa população, maior será o tamanho efetivo. Além disso, quanto maior o número de indivíduos associados ao tamanho efetivo próximo ao tamanho amostral da população, maior será a probabilidade de reter o máximo do potencial evolutivo (NUNNEY e CAMPBELL, 1993). Contudo, o potencial evolutivo de espécies vem reduzindo drasticamente devido à destruição de habitat, acompanhada de reduções das populações e do número de indivíduos (TARAZI *et al.*, 2010).

A mata atlântica brasileira é considerada uma das florestas com maior biodiversidade e endemismo do mundo. Essa floresta cobria originalmente 17,4% (1.3953.849 km²) do território nacional, mas atualmente encontra-se altamente fragmentada com menos de 12% (163.775 km²) de

sua área original. Quase 80% dos fragmentos florestais apresentam menos de 50 ha e apenas 9% dos remanescentes florestais estão em unidades de conservação (RIBEIRO *et al.*, 2009). Com isso, diversas espécies estão em risco de extinção devido a redução do número de indivíduos e destruição de hábitat (TARAZI *et al.*, 2010). Para garantir a funcionalidade ecológica do que restou das florestas, há a necessidade de conservar e estudar os produtores primários, principalmente as árvores, que apresentam maior resiliência (LAWRENCE *et al.*, 2010). Para que as árvores detenham a capacidade de colonizar ambientes degradados, as mesmas necessitam de diversidade genética para que seus propágulos suportem diferentes condições edafo-climáticas dos ambientes antrópicos (FRAKHAM *et al.*, 2009). Para isso, estudos relacionados com o potencial evolutivo tornam-se essenciais para que se conheça a capacidade das populações remanescentes em suportar mudanças climáticas e colonizar áreas degradadas.

Um cenário ideal para estudar o potencial evolutivo de espécies arbóreas é o sul da Bahia. Pois, muitas populações remanescentes estão incluídas no Corredor Central da Mata Atlântica da Bahia, o que auxilia na manutenção dessas populações. Utilizando populações ainda conservadas de uma espécie guarda-chuva, como *Eschweilera ovata* (Lecythidaceae), é possível delinear estratégias de restauração no presente, sem comprometer a diversidade genética e potencial adaptativo da espécie no futuro. Dessa forma, criando um modelo de conservação para outras espécies arbóreas da Mata Atlântica com características semelhantes.

OBJETIVO GERAL: *Sintetizar a finalidade geral do projeto.*

Conhecer o potencial evolutivo de *Eschweilera ovata* (Lecythidaceae) em remanescentes florestais inseridos no Minicorredor Conduru – Boa Esperança do sul da Bahia, visando subsidiar políticas públicas para conservação da espécie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: *Desdobrar o objetivo geral em finalidades de caráter mais específico.*

Estimar o fluxo gênico histórico, estrutura genética espacial entre e dentro de populações através da análise de coancestria de indivíduos adultos de *E. ovata*, obtendo assim, um retrato histórico da distribuição de genes.

Recomendar com as estimativas de coancestria, a distância mínima de coleta de sementes entre árvores matrizes, assim como a maneira de distribuir-las em programas de restauração, a fim de manter o potencial evolutivo da espécie e sua forma histórica de colonização (fluxo gênico histórico).

REVISÃO DE LITERATURA (OU MODELO TEÓRICO)

Além das conseqüências ecológicas geradas pelo desmatamento, há conseqüências genéticas que contribuem para o risco de extinção de populações e espécies. O desmatamento produz uma redução imediata no número de alelos que está associada a uma redução no tamanho populacional. Flutuações populacionais ou populações pequenas resultam em deriva genética, que por sua vez leva à fixação de alelos e, conseqüentemente, à perda de diversidade genética (REED, 2005). Populações de plantas em ambientes fragmentados tendem a apresentar um aumento na taxa de autofecundação e de cruzamentos correlacionados, conseqüentemente elevando a endogamia e a divergência genética interpopulacional (TARAZI *et al.*, 2010). A endogamia impacta negativamente plantas que apresentam fecundação cruzada, pois com o aumento da endogamia, aumenta a probabilidade de alelos deletérios estarem em homozigose, contribuindo para a depressão por endogamia. A endogamia também reduz a heterozigosidade e a adaptabilidade das espécies, aumentando a probabilidade de extinção. No sentido de manter a viabilidade evolutiva de espécies, estudos genéticos permitem mensurar o quanto restou de diversidade genética, além de auxiliar programas de conservação e manejo (REED, 2005;).

No sentido de caracterizar e comparar os níveis de variação genética em populações naturais tem sido empregado o número médio de alelos por loco (A), a heterozigosidade observada (H_o), a heterozigosidade esperada ou, diversidade genética (H_e), o índice de fixação (F) e o tamanho efetivo populacional (N_e). H_o é obtida a partir das freqüências genotípicas e H_e é obtida a partir das freqüências alélicas de uma população. O valor de H_e permite mensurar o nível de diversidade genética em uma população de uma determinada espécie, independentemente do sistema de reprodução. F é uma estatística que mensura desvios das freqüências genotípicas em relação ao esperado sob panmixia. Desvios da panmixia podem ser provocados por vários fatores, entre eles estão o modo e sistema de reprodução, cruzamentos entre aparentados e as forças evolutivas (FRANKHAM *et al.*, 2009). N_e é o tamanho de uma população idealizada cuja composição genética é influenciada por fatores estocásticos, da mesma maneira que uma população real de tamanho N . Em outras palavras, N_e é o tamanho de uma população idealizada que apresenta o mesmo montante de deriva genética na freqüência alélica, ou o mesmo decréscimo na heterozigosidade que uma população real. Dessa forma, o parâmetro N_e permite a distinção entre o número amostral e a representatividade genética da amostra. Existe uma complexa relação entre N_e e N devido a diversos fatores, entre eles estão a oscilação do tamanho populacional, modo e sistema de reprodução, o número de genitores, o desvio da razão sexual de 1:1, as variações no sucesso reprodutivo, sobreposição de gerações, presença de estrutura genética e endogamia (NUNNEY e CAMPBELL, 1993; REED, 2005).

Para manter estável a endogamia e a deriva genética, faz-se necessária a manutenção de um tamanho efetivo populacional adequado, com isso diminuindo o risco de extinção de populações e espécies (REED, 2005). O tamanho efetivo mínimo de 50 seria suficiente para manter estável a

endogamia e a deriva em uma população panmítica por poucas gerações. Mas, para manter a endogamia e deriva estáveis em médio prazo seria necessário um $N_e = 500$. À medida que N_e aumenta, a deriva genética torna-se menos significativa como força evolutiva, até que em populações grandes, o equilíbrio da variância genética torna-se estritamente dependente do balanço entre mutação e seleção (NUNNEY e CAMPBELL, 1993).

Apenas a manutenção de um tamanho efetivo adequado não garante a persistência de populações ao longo de várias gerações. Para isso, foi criado o conceito de população mínima viável (*PMV*), que representa o número mínimo de indivíduos para permanência de uma população ao longo de 40 gerações, associado a uma probabilidade estatística de 0,99. O cálculo de *PMV* associa a probabilidade de extinção de uma população gerada por efeitos demográficos estocásticos e aqueles gerados pela deriva genética. Dessa forma, uma *PMV* equivale no mínimo a cinco vezes o valor de $N_e = 50$. Para manutenção de uma *PMV* tem-se a necessidade de manter uma área mínima viável (*AMV*), cuja relação baseia-se num tamanho efetivo de referência pela densidade da população (NUNNEY e CAMPBELL, 1993).

METODOLOGIA: *Descrever detalhadamente a metodologia a ser utilizada no desenvolvimento do projeto*

Local de estudo e Amostragem

As áreas de estudo serão nos municípios de Ilhéus, Itacaré e Uruçuca, todas localizadas dentro do Minicorredor Conduru – Boa Esperança na região Sul do Estado da Bahia, Brasil. Para quantificar a diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico histórico serão amostrados 50 indivíduos de *E. ovata* com Diâmetro à Altura do Peito (DAP) ≥ 15 cm por remanescente. As árvores adultas são responsáveis por reter a diversidade genética que será transmitida para a próxima geração. Serão amostrados 50 indivíduos espalhados pelo remanescente em pelo menos quatro remanescentes. Essa metodologia permite comparar o número de alelos e a diversidade genética existe entre locais utilizando a mesma quantidade de indivíduos, independentemente da sua distribuição e abundância.

Extração de DNA e genotipagem de locos SSR

A extração de DNA genômico total, assim como a quantificação de DNA e obtenção de produtos de PCR para análise dos locos SSR serão realizadas segundo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). A leitura dos alelos será realizada primeiramente em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata para validação dos SSR desenvolvidos. Posteriormente será utilizado seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) para genotipagem. Será utilizado o

programa GeneMapper v.3.0 (Applied Biosystems), delimitando-se o “Bin set” de acordo com os tamanhos de fragmentos esperados. Os dados analisados pelo programa, com duas casas decimais, serão diretamente exportados para planilhas em Excel, e arredondados para números inteiros.

Análise da diversidade genética

As estimativas das freqüências alélicas, juntamente com o número de alelos por loco (A), o número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = \frac{1}{1 - \hat{H}_e}$), das heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e) e dos índices de fixação (F), serão realizadas com auxílio do programa SPAGEDI (HARDY e VEKEMANS, 2002). Para verificar a significância de F será realizado o procedimento de 10.000 permutações sobre os locos ao nível de 5% de probabilidade, utilizando correção de Bonferroni e empregando-se o programa SPAGEDI. Para comparação das médias de A , A_e , H_o , H_e e F entre populações será calculado um intervalo de confiança a 95% a partir do erro padrão utilizando o método Jackknife sobre locos.

Estrutura genética espacial

Para a análise da estrutura genética espacial, será utilizado o programa SPAGEDI (HARDY e VEKEMANS, 2002). A caracterização da distribuição espacial dos genótipos dentro da população será realizada a partir das estimativas dos coeficientes de coancestria (θ_{xy}) entre pares de plantas, dentro de diferentes classes de distância. O coeficiente de coancestria será calculado por:

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk})(p_{yjk} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k (1 - \bar{p}_{lk})\bar{p}_{lk}} + \left[\sum_l \frac{1}{(2n_l - 1)} \right].$$

sendo p_{xlk} e p_{yjk} = freqüências do alelo k no loco l nos indivíduos x e y (assumindo valores de 0, 0,5 e 1 em indivíduos homocigotos para o alelo alternativo, heterocigotos e homocigotos para o alelo sob consideração, respectivamente) e \bar{p}_{lk} = média da freqüência do alelo k no loco l na subpopulação com n_l (número de genes) no loco l . Para obter o intervalo de confiança a 95% de probabilidade serão realizadas 10.000 permutações de genótipos entre classes de distância.

Além da obtenção do correlograma do coeficiente de coancestria (θ_{xy}) pelas classes de distâncias, será analisado o mesmo coeficiente para todas as combinações entre pares de plantas com intuito de verificar a distância máxima nas quais os indivíduos encontravam-se relacionados no

grau de irmãos-completos ($\theta_{xy} = 0,25$), meios-irmãos ($\theta_{xy} = 0,125$) e primos ($\theta_{xy} = 0,0625$).

Estimativa do tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação

O tamanho efetivo populacional (N_e) será estimado na geração adulta conforme expressão, envolvendo as estimativas do índice de fixação (F) e do coeficiente de coancestria médio (Θ) da

geração sob consideração:
$$\hat{N}_e = \frac{0,5}{\hat{\Theta} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1+\hat{F}}{2n}} .$$

Em que, n = tamanho amostral.

O coeficiente de coancestria médio dentro das diferentes populações será estimado pela

expressão:
$$\hat{\Theta} = \frac{n\hat{\theta}_{ii} + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \hat{\theta}_{ij} (1 + \hat{F})}{n^2}$$
, em que, θ_{ii} = estimativa da autocoancestria dos indivíduos,

$\sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \theta_{ij}$ = soma de todas as estimativas das coancestrias entre os pares de indivíduos de uma população, excluindo a autocoancestria, n = tamanho amostral e F = estimativa do índice de fixação da população.

A área mínima viável (\hat{AMV}) para conservação genética *in situ* será estimada em função do tamanho efetivo de referência ($N_{e(ref)} = 50, 500$ e 1000):
$$\hat{AMV} = \frac{N_{e(ref)}}{d \left(\hat{N}_e / n \right)}$$
. Em que, \hat{N}_e / n = relação

entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral e d = densidade de indivíduos por hectare. Esta \hat{AMV} reterá uma população mínima viável (PMV) para conservação dos caracteres quantitativos e, conseqüentemente, do potencial evolutivo (NUNNEY e CAMPBELL, 1993).

Estrutura genética entre populações e fluxo gênico histórico

A estrutura genética e o fluxo gênico histórico entre as populações serão calculados com a finalidade de verificar se as mesmas representavam uma metapopulação. Além disso, existe a finalidade de propor se cada unidade de conservação representa uma unidade significativa evolucionária (USE) e/ou uma unidade independente para manejo (UIM) segundo classificações propostos por Palsboll *et al.* (2007). Para estas finalidades, serão estimadas as divergências genéticas com a estatística F de Weir e Cockerham utilizando o programa computacional FSTAT (versão 2.9.3) de Goudet (2001).

INFRA-ESTRUTURA DISPONÍVEL: *Especificar a infra-estrutura para execução do projeto*

O laboratório de Genética e Biologia Molecular da UESC possui toda a infra-estrutura necessária para a genotipagem de amostras em larga escala, tal como proposto no presente projeto de pesquisa. O projeto poderá contar com dois termocicladores, duas microcentrífugas, dois freezer - 20°C, uma geladeira, um ultrafreezer, quatro sistemas de eletroforese horizontal, um microondas, um sistema de fotodocumentação de géis, um pHmêtro, uma balança analítica, uma capela de exaustão, dois banhos-maria, um vórtex, um agitador magnético, uma seqüenciador manual. O sequenciamento automático de DNA será realizado em instituições parceiras. O material de campo já encontra-se a disposição. São quatro trenas, pregos, dois martelos, quatro balizas, centenas de canos de PVC para marcar a área, etiquetas de alumínio, fita crepe, duas atiradeiras, sacos de coleta, cinco capacetes, cinco óculos de proteção, quatro pares de perneiras contra picadas de serpentes, dois aparelhos GPS de alta precisão GARMIN. Tais equipamentos são suficientes para que todas as questões biológicas levantadas sejam respondidas dentro do prazo estabelecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: *Máximo de 10 referências*

- FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: CENARGEN-EMBRAPA-Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998. 220p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. 617 p.
- GOUDET, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 07 Mar. 2012.
- HARDY, O.J.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Loughborough, v.2, p.618-620, 2002.
- LAWRENCE, D.; RADEL, C.A.; TULLY, K.; SCHMOOK, B.; SCHNEIDER, L. Untangling a decline in tropical forest resilience: constraints on the sustainability of shifting cultivation across the globe. **Biotropica**, v.42, n.1, p.21-30, 2010.
- NUNNEY, L.; CAMPBELL, K.A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 8, p.234-239, 1993.
- PALSBOLL, P.J.; BERUBE, M., ALLENDORF, F.W..Identification of management units using population genetic data. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2007.
- REED, D.H. Relationship between population size and fitness. **Conservation Biology** v.19, p. 563–568, 2005
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, p.1141-1153, 2009.
- TARAZI, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Conservation Genetics**, v.11, p.965-976, 2010.

Barema
Projeto de Pesquisa do Orientador

| Avaliador 1 | Data: / / |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Critérios | Pontuação 0-10 pontos |
| 1. Clareza e congruência na definição dos objetivos | |
| 2. Introdução e justificativa | |
| 3. Adequação da metodologia | |
| 4. Adequação do(s) plano(s) de trabalho ao projeto Todos os planos estão adequados () sim () não Se NÃO, especifique qual: | |
| 5. Relevância do(s) plano(s) de trabalho para a formação científica do(s) discente(s) | |
| 6. Adequação do cronograma do(s) plano(s) de trabalho | |
| Nota avaliador 1 = Média da pontuação dos itens | |
| Assinatura do Avaliador 1 | |

| Avaliador 2 | Data: / / |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Critérios | Pontuação 0-10 pontos |
| 1. Clareza e congruência na definição dos objetivos | |
| 2. Introdução e justificativa | |
| 3. Adequação da metodologia | |
| 4. Adequação do(s) plano(s) de trabalho ao projeto Todos os planos estão adequados () sim () não Se NÃO, especifique qual: | |
| 5. Relevância do(s) plano(s) de trabalho para a formação científica do(s) discente(s) | |
| 6. Adequação do cronograma do(s) plano(s) de trabalho | |
| Nota avaliador 2 = Média da pontuação dos itens | |
| Assinatura do Avaliador 2 | |

| | |
|--------------------------------------------------------------|--|
| Nota Final Projeto de Iniciação Científica PROIC/UESC | |
|--------------------------------------------------------------|--|

Plano de Trabalho do Discente

TÍTULO DO PLANO DE TRABALHO

Histórico de colonização de *Eschweilera ovata* no Minicorredor Conduru – Boa Esperança da Bahia, revelada por meio de marcadores microssatélites cloroplastidiais.

1. OBJETIVO ESPECÍFICO DO PLANO DO DISCENTE

Investigar o histórico de colonização da espécie *Eschweilera ovata* pela região do Minicorredor Conduru – Boa Esperança, BA, utilizando marcadores microssatélites cloroplastidiais universais.

2. RESULTADOS ESPECÍFICOS DO PLANO E ORIENTAÇÃO DO DISCENTE

(Resultados específicos do plano e a capacitação a ser atingida pelo estudante ao final da bolsa)

Internalização de conhecimento sobre biogeografia e genética da conservação.

Capacitação para trabalhos em campo e em laboratórios de marcadores moleculares.

Genotipagem de indivíduos adultos de *E. ovata* com marcadores cloroplastidiais universais pelo Minicorredor Conduru – Boa Esperança, BA.

Demonstração do processo de colonização de *E. ovata* através do estudo da estrutura genética espacial e análises filogeográficas.

Orientação e preparo direcionado ao mestrado de genética e biologia molecular.

Publicação de resumo em congressos e de artigo em revista com indexada.

3. METODOLOGIA (Material e métodos empregados)

Serão marcados, mensurados, mapeados e coletados amostras foliares de 100 indivíduos adultos de *E. ovata* com a finalidade de genotipá-los com marcadores microssatélites cloroplastidiais. Os indivíduos selecionados estarão distribuídos pelos remanescentes florestais do Minicorredor Conduru – Boa Esperança. Para a análise dos locos cpSSR, cada combinação alélica única entre os locos cpSSR analisados será considerada um haplótipo. Serão estimados o número de haplótipos

(\hat{n}_h), a diversidade haplotípica ($\hat{h} = [n_k / (n_k - 1)] (1 - \sum_i^n p_i^2)$) e o número efetivo de haplótipos

($\hat{n}_e = 1 / \sum p_i^2$) de acordo com Nei (1987), em que, n_k = o número de indivíduos amostrados na

população k e p_i = a frequência do i -ésimo haplótipo. Também será analisado a estrutura genética espacial (EGE) com a finalidade de conhecer a dispersão histórica de sementes. A análise da EGE dar-se-á através do Índice I de Moran (SOKAL e ODEN, 1978). Para a análise da EGE, os dados de

cada haplótipo serão codificados para suas freqüências alélicas sendo considerados genótipos homozigóticos que receberão valor 1,0. As extensões das classes de distâncias serão selecionadas para obter-se um mínimo de 30 pares de dados para cada classe selecionada. Os valores do índice *I* de Moran serão calculados para cada uma das classes de distância, em cada loco, e para a média

dos locos dada pela expressão geral:
$$I = \frac{n \sum_i \sum_j w_{ij} z_i z_j}{w \sum_i z_i^2}$$
, em que: *w* é a soma de todos os pares de

dados usados em todas as classes de distância; *i* e *j* são a localização de cada dado em uma classe de distância e *z* é o desvio da freqüência alélica. Os valores estimados do índice *I* de Moran serão utilizados para testar a significância dos desvios dos valores esperados, $E(I) = -1/(n-1)$, sobre a hipótese de nulidade de distribuição aleatória. Será realizado o teste Monte-Carlo com 1000 permutações sobre a localização de cada genótipo a fim de se obter intervalos de confiança. A significância total de cada correlograma será testada usando critérios de Bonferroni. Todas as análises serão realizadas empregando-se o programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). Para uma abordagem filogeográfica (processo de colonização) serão utilizados dados da localização dos indivíduos nos remanescentes e seus respectivos genótipos e computados utilizando software GEODIS 2.5 (POSADA et al., 2006).

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES PARA O CANDIDATO *(insira quantas linhas forem necessárias)*

| MESES – 12 meses | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Metas | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Revisão bibliográfica | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Localizar 100 indivíduos de <i>E. ovata</i> espalhados pelos remanescentes florestais no Minicorredor Conduru – Boa Esperança. | X | X | X | X | X | X | X | | | | | |
| Extrair o DNA dos indivíduos selecionados | | | | X | X | X | X | | | | | |
| Genotipar 100 indivíduos utilizando os cpSSR | | | | | | | X | X | X | X | | |
| Analisar o processo de colonização e realizar as análises estatísticas | | | | | | | | X | X | X | X | |
| Entregar o relatório parcial | | | | | | X | | | | | | |
| Entregar o relatório final | | | | | | | | | | | | X |
| Participar de congressos | | | | | | | | | | X | | |

Plano de Trabalho do Discente

TÍTULO DO PLANO DE TRABALHO

Estrutura genética de *Eschweilera ovata* no Minicorredor Conduru – Boa Esperança da Bahia, revelada por marcadores SSR nucleares.

1. OBJETIVO ESPECÍFICO DO PLANO DO DISCENTE

Estimar a diversidade e estrutura genética de *Eschweilera ovata* no Minicorredor Conduru – Boa Esperança da Bahia, utilizando marcadores microssatélites nucleares.

2. RESULTADOS ESPECÍFICOS DO PLANO E ORIENTAÇÃO DO DISCENTE

(Resultados específicos do plano e a capacitação a ser atingida pelo estudante ao final da bolsa)

Internalização de conhecimento sobre genética de populações e genética da conservação.

Capacitação para trabalhos em campo e em laboratórios de marcadores moleculares.

Genotipagem de indivíduos adultos de *E. ovata* com marcadores SSR nucleares no Minicorredor Conduru – Boa Esperança da Bahia.

Quantificação da diversidade e estrutura genética de *E. ovata* através de marcadores SSR nucleares.

Orientação e preparo direcionado ao mestrado de genética e biologia molecular.

Publicação de resumo em congressos e de artigo em revista com indexada.

3. METODOLOGIA (Material e métodos empregados)

Serão marcados, mensurados, mapeados e coletados amostras foliares de 200 indivíduos adultos de *E. ovata* com a finalidade de genotipá-los com marcadores microssatélites nucleares. Os indivíduos selecionados estarão distribuídos pelos remanescentes florestais do Minicorredor Conduru – Boa Esperança. Serão coletados 50 indivíduos por remanescente. As estimativas das frequências alélicas, juntamente com o número de alelos por loco (A), o número efetivo de alelos por loco

($\hat{A}_e = \frac{1}{1 - \hat{H}_e}$), das heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e) e dos índices de

fixação (F), serão realizadas com auxílio do programa SPAGEDI (HARDY e VEKEMANS, 2002).

Para verificar a significância de F será realizado o procedimento de 10.000 permutações sobre os locos ao nível de 5% de probabilidade, utilizando correção de Bonferroni e empregando-se o programa SPAGEDI. Para comparação das médias de A , A_e , H_o , H_e e F entre remanescentes

será calculado um intervalo de confiança a 95% a partir do erro padrão utilizando o método Jackknife sobre locos. A estrutura genética entre indivíduos dos remanescentes será estimada com a finalidade de verificar se as mesmas representavam uma metapopulação. Além disso, existe a finalidade de propor se cada unidade de conservação representa uma unidade significativa evolucionária (USE) e/ou uma unidade independente para manejo (UIM) segundo classificações propostos por Palsboll *et al.* (2007). Para estas finalidades, serão estimadas as divergências genéticas com a estatística F de Weir e Cockerham utilizando o programa computacional FSTAT (versão 2.9.3) de Goudet (2001).

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES PARA O CANDIDATO (*insira quantas linhas forem necessárias*)

| Metas | MESES – 12 meses | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Revisão bibliográfica | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Localizar 200 indivíduos de <i>E. ovata</i> espalhados pelos remanescentes florestais no Minicorredor Conduru – Boa Esperança. | X | X | X | X | X | X | X | | | | | |
| Extrair o DNA dos indivíduos selecionados | | | | X | X | X | X | | | | | |
| Genotipar 200 indivíduos utilizando os SSR nucleares | | | | | | | X | X | X | X | | |
| Analisar a estrutura e diversidade genética dos indivíduos selecionados. | | | | | | | | X | X | X | X | |
| Entregar o relatório parcial | | | | | | X | | | | | | |
| Entregar o relatório final | | | | | | | | | | | | X |
| Participar de congressos | | | | | | | | | | X | | |