

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**“Estrutura e diversidade genética de populações naturais de *Ficus* spp.
(Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo”**

Alison Gonçalves Nazareno

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências de Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**“Estrutura e diversidade genética de populações naturais de *Ficus* spp.
(Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo”**

Alison Gonçalves Nazareno

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências de Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nazareno, Alison Gonçalves

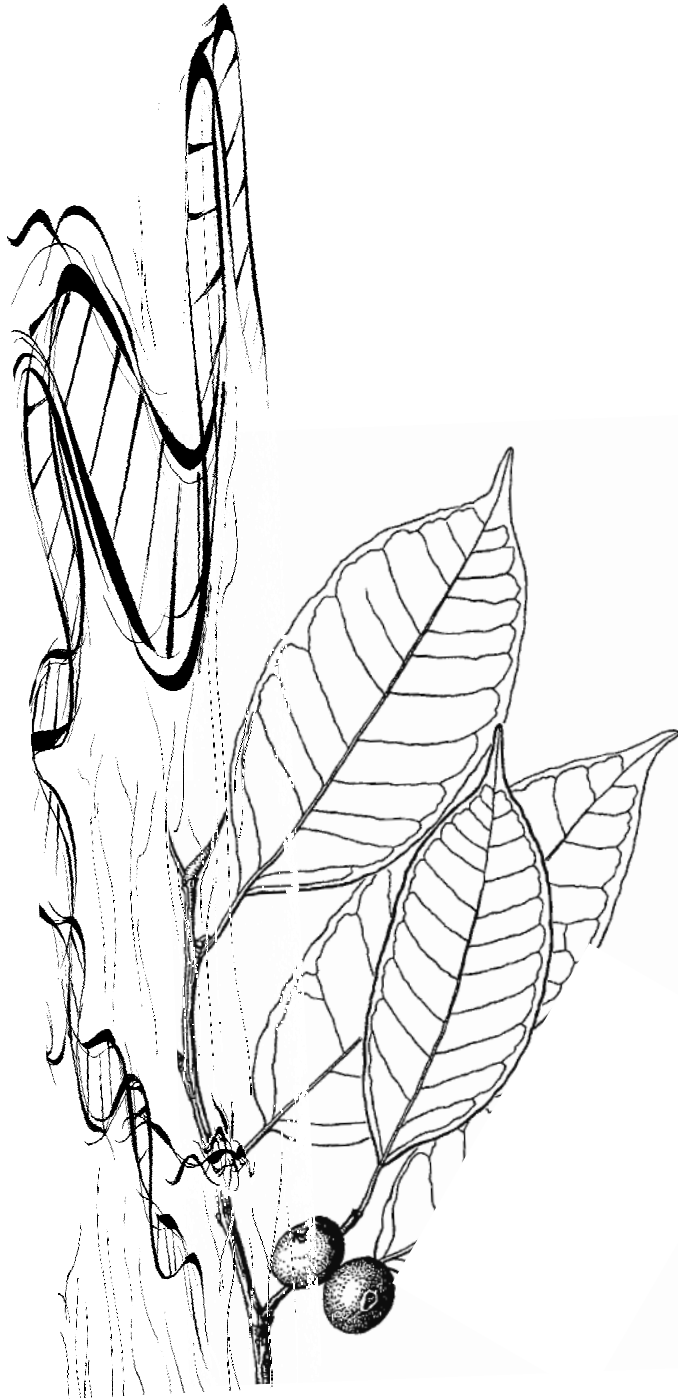
Estrutura e diversidade genética de populações naturais de *Ficus* spp. (Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo, 2009.

105 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Rodrigo Augusto Santinelo Pereira

1. Conservação. 2. *Ficus citrifolia*. 3. *Ficus eximia*. 4. Fragmentação Florestal. 5. Genética de populações.



À minha família, aos meus amigos e a todos que compreendem a importância da conservação dos recursos naturais, dedico com todo meu apreço.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP) e ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) onde todo o trabalho foi desenvolvido;

Às Instituições que apoiaram este estudo: CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para participação em congressos; Instituto Florestal por permitir a realização desta pesquisa e pelo apoio e facilidades nas áreas de estudo; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio aos Programas Jovem Pesquisador (R.A.S.P #04/10299-4, A.L.A.M. #03/04199-4/2004); FAEPA e Pró-Reitoria da Universidade de São Paulo pelo apoio financeiro;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira pela oportunidade, orientação e pelas contribuições enriquecedoras no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Lilia Alzate Marin pelo apoio, dedicação, ensinamentos e por ter acreditado na minha capacidade para realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Moacyr Antonio Mestriner pelo incentivo e pela confiança depositada no Laboratório de Genética Vegetal da FMRP;

Aos docentes do Departamento de Biologia (FFCLRP/USP) pelos ensinamentos;

Ao Finn Kjellberg pelas sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho e ao Dr. Alexandre Sebbenn pelo apoio nas análises dos dados;

Aos colegas Mariana Lapate, Luiz Francisco e Luciano que muito me ajudaram na coleta do material nas áreas de estudo;

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética Vegetal e Ecologia Vegetal;

Aos amigos que mesmo distantes se tornaram presentes e, aos amigos presentes que muito me ajudaram, em especial agradeço à Juliana M. Feres, Marcela C. Guidugli, Márcia Passetto, Vani e Vanessa Tragante do Ó;

À toda minha família, em especial à minha querida mãe e aos meus irmãos Tales, Rafael e Ana Carolina;

A Deus por ter me dado força e coragem para vencer mais esta etapa.

Este trabalho é vinculado ao CEEFLORUSP (Centro de Estudos e Extensão Florestal da USP-RP).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Efeitos genéticos da fragmentação florestal.....	14
1.2 Significado ecológico do gênero <i>Ficus</i>	16
1.3 A polinização em <i>Ficus</i>	19
1.4 Consequências genéticas do mutualismo <i>Ficus</i> – vespas do figo	20
1.5 As espécies <i>Ficus citrifolia</i> P. Miller e <i>Ficus eximia</i> Schott.	21
1.6 Estudos de diversidade genética com auxílio de marcadores	24
1.7 Marcadores microssatélites.....	25
1.8 Diversidade e estrutura genética em populações de plantas	27
2. OBJETIVO GERAL	30
3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	31
CAPÍTULO I	
Transferência e caracterização de marcadores microssatélites em <i>Ficus citrifolia</i> P. Miller e <i>Ficus eximia</i> Schott.....	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Espécies e local de estudo.....	37
2.2 Extração e quantificação do DNA	38
2.3 Transferibilidade de marcadores microssatélites	39
2.4 Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	40
2.5 Determinação dos produtos amplificados	41
2.6 A eletroforese.....	41
2.7 Coloração do gel com nitrato de prata e secagem.....	43
2.8 Análise dos dados	43
2.8.1 Análise do desequilíbrio de ligação	44
2.8.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	44
2.8.3 Caracterização da variação genética	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4. CONCLUSÃO	48

CAPÍTULO II

Estrutura e diversidade genética de populações naturais de <i>Ficus</i> spp. (Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo	51
RESUMO	52
ABSTRACT	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 Áreas de estudo	57
2.1.1 Paisagem muito fragmentada	58
2.1.2 Paisagem medianamente fragmentada	59
2.1.3 Paisagem pouco fragmentada	59
2.2 Amostragem.....	60
2.3 Extração e amplificação de DNA para análises genéticas	64
2.4 Análise dos dados	65
2.4.1 Análise do desequilíbrio de ligação	65
2.4.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	66
2.4.3 Aderência ao Equilíbrio de mutação e deriva	66
2.4.4 Diversidade genética intrapopulacional	67
2.4.5 Estrutura genética.....	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1 Desequilíbrio de ligação	69
3.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weibeng.....	69
3.3 Aderência ao equilíbrio de mutação e deriva.....	70
3.4 Diversidade genética intrapopulacional.....	72
3.4.1 Freqüências alélicas	72
3.4.2 Índices de variabilidade genética	76
3.4.3 Perda de diversidade genética	78
3.5 Estrutura genética	81
3.6 Variação genética entre <i>Ficus citrifolia</i> e <i>Ficus eximia</i>	84
4. CONCLUSÕES	88
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Inflorescência do gênero *Ficus*, o sicônio ou figo, em forma de urna e aberta apicalmente pelo ostíolo (1) que é formado por um conjunto de brácteas (2) que dificultam a entrada de muitos organismos no lúmen do figo (3). Na parede do figo (4) estão inseridas as flores femininas (5) e as masculinas (6) que, nas espécies monóicas amadurecem algumas semanas após o surgimento das flores femininas caracterizando a protoginia. Modificado de Weiblen (2000)..... 16
- FIGURA 2** - Ciclo de desenvolvimento do figo e das vespas do figo nas fases: (1) pré-feminina, (2) feminina, (3) interfloral, (4) masculina e (5) pós-floral. Modificado de Ramirez (1970)..... 18
- FIGURA 3** - *Ficus citrifolia* P. Miller (A-D) e *Ficus eximia* Schott (E-G). 23
- FIGURA 4** - Localização das áreas de estudo no Estado de São Paulo. (A) Região do Pontal do Paranapanema, (B) Região do município de Gália e (C) Região de Ribeirão Preto. Fonte: L.F.M. Coelho, dados não publicados..... 57
- FIGURA 5** - Distribuição espacial dos indivíduos amostrados (N) de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* na Estação Ecológica de Ribeirão Preto. Coordenadas UTM (Datum Córrego Alegre)..... 61
- FIGURA 6** - Distribuição espacial dos indivíduos amostrados (N) de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* na Estação Ecológica de Caetetus. Coordenadas UTM (Datum Córrego Alegre)..... 62
- FIGURA 7** - Distribuição espacial dos indivíduos amostrados (N) de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* no Parque Estadual Morro do Diabo. Coordenadas UTM (Datum Córrego Alegre)..... 63
- FIGURA 8** - Número total de alelos, alelos raros e exclusivos para as populações de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD – 33.000 ha), na Estação Ecológica de Caetetus (EEC – 2.000 ha) e na Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP – 200 ha)..... 75

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Marcadores SSR testados; número de acesso ao GenBank, produto de amplificação esperado em pares de base (pb) e temperatura de anelamento (T_a °C) padronizada nas espécies *Ficus insipida* (Fins)^a, *Ficus montana* (Fmo)^b, *Ficus racemosa* (Frac)^c e *Ficus rubiginosa* (Frub)^c..... 40
- TABELA 2.** Locos microssatélites desenvolvidos para *Ficus insipida* (Fins), *Ficus montana* (Fmo), *Ficus rubiginosa* (Frub) e *Ficus racemosa* (Frac) e transferidos (+) para *Ficus citrifolia* e para *Ficus eximia*. 46
- TABELA 3.** Caracterização dos marcadores microssatélites transferidos para 60 indivíduos de *Ficus citrifolia* e para 60 indivíduos de *Ficus eximia* amostrados nas populações do Parque Estadual Morro do Diabo e na Estação Ecológica de Caetetus no interior do Estado de São Paulo..... 49
- TABELA 4.** Marcadores SSR transferidos e caracterizados para *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia*..... 65
- TABELA 5.** Presença de alelos nulos e probabilidades do teste exato de Fisher para a hipótese do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os indivíduos de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* nos fragmentos Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP)..... 70
- TABELA 6.** Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Ficus citrifolia* nas populações do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), da Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e da Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP)..... 71
- TABELA 7.** Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Ficus eximia* nas populações do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), da Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e da Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP)..... 71

- TABELA 8.** Frequências alélicas em locos microssatélites de *Ficus citrifolia* no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), na Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e na Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP)..... 73
- TABELA 9.** Frequências alélicas em locos microssatélites de *Ficus eximia* no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), na Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e na Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP)..... 75
- TABELA 10.** Índices de diversidade genética das populações de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), da Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e da Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP). \hat{A} : número médio de alelos por loco, H_o : heterozigosidade média observada, H_e : heterozigosidade média esperada e f^* : índice de fixação..... 76
- TABELA 11.** Valores de probabilidade (gerados por 5.000 permutações) dos testes de igualdade entre populações para os índices de diversidade genética. A : número médio de alelos por loco; H_o : heterozigosidade média observada e H_e : heterozigosidade média esperada para as populações de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), da Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e da Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP)..... 79
- TABELA 12.** Estimativas dos coeficientes médios de endogamia dentro das populações (F_{IS}), do conjunto das populações (F_{IT}) e da divergência genética entre populações (F_{ST}) de *Ficus citrifolia* do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Estação Ecológica Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP)..... 82
- TABELA 13.** Estimativas dos coeficientes médios de endogamia dentro das populações (F_{IS}), do conjunto das populações (F_{IT}) e da divergência genética entre populações (F_{ST}) de *Ficus eximia* do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Estação Ecológica Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP)..... 82

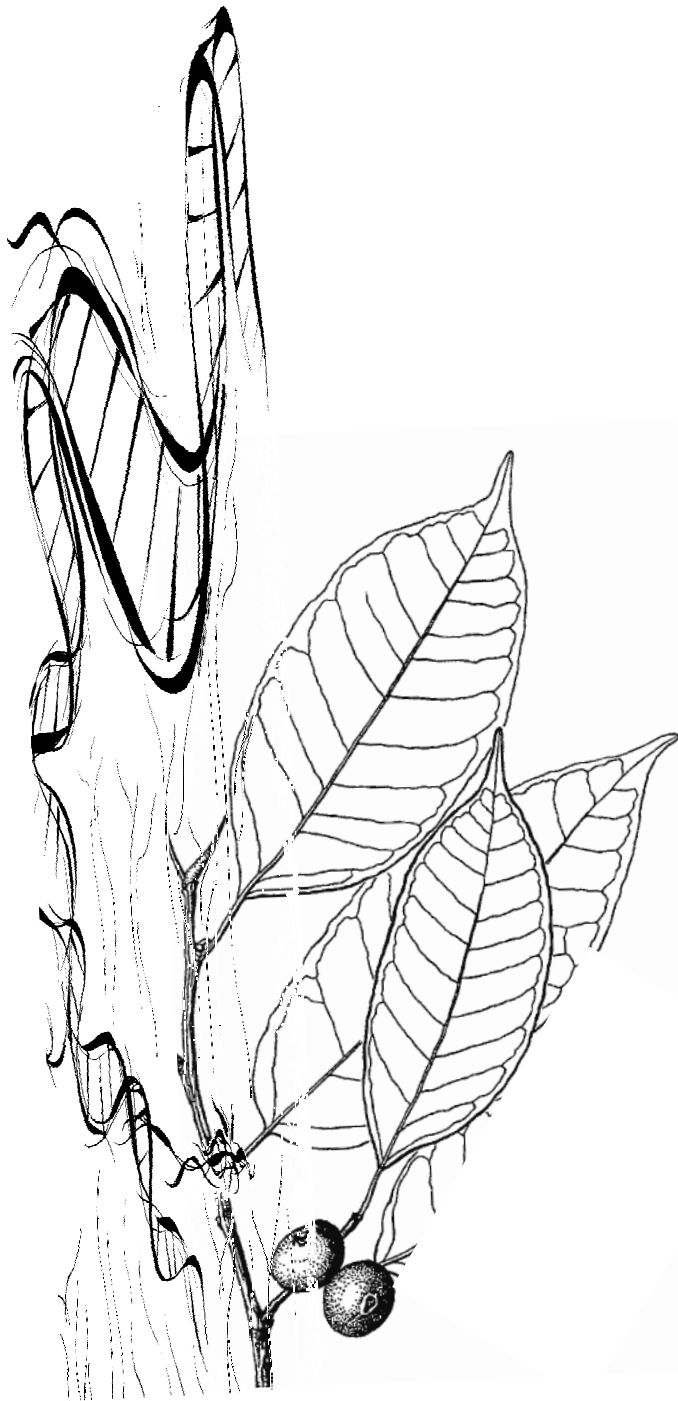
TABELA 14. Valores de probabilidades (gerados por 5.000 permutações) dos testes de igualdade entre *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* para os índices de diversidade genética. *A*: número médio de alelos por loco; *H_o*: heterozigosidade média observada e *H_e*: heterozigosidade média esperada.
..... 85

RESUMO

Em vista das atuais taxas de destruição e fragmentação das florestas tropicais, as populações vegetais estão experimentando contrações em seus tamanhos populacionais e algumas espécies podem ser mais afetadas pela estocasticidade demográfica e deriva genética do que outras. Estudos que permitam entender os efeitos da fragmentação florestal sobre a genética de populações, bem como o delineamento de estratégias para a conservação *in situ* e *ex situ* de espécies são imprescindíveis. As espécies do gênero *Ficus* (Moraceae) são importantes nas florestas tropicais por fornecerem recursos alimentares a diversos grupos de vertebrados e por estabelecerem mutualismo com vespas polinizadoras. Populações naturais de *Ficus citrifolia* P. Miller e *Ficus eximia* Schott, em fragmentos de florestas semidecíduas no Estado de São Paulo (Parque Estadual Morro do Diabo - PEMD ~ 33.000 ha, Estação Ecológica Caetetus - EEC ~ 2.000 ha e Estação Ecológica de Ribeirão Preto ~ EERP - 200 ha), foram amostradas para avaliar se a redução e a fragmentação de habitat podem causar perda de diversidade e modificações na estrutura genética em suas populações. Com o intuito de obter uma ferramenta útil no estudo de genética populacional, marcadores microssátelites desenvolvidos em espécies de *Ficus* foram transferidos e caracterizados em *F. citrifolia* e *F. eximia*. Os resultados encontrados para as espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* permitiram inferir que a perda e a fragmentação de habitat reduzem a riqueza alélica dessas espécies. No entanto, *F. citrifolia* e *F. eximia* apresentam elevada variabilidade genética, ausência de endogamia, presença de alelos raros e exclusivos em suas populações e uma alta distribuição da variabilidade genética intrapopulacional. Esses resultados são reflexos do sistema reprodutivo da espécie (alogamia) e da especificidade e capacidade de vôo de suas vespas polinizadoras, que dispersaram grãos de pólen a longas distâncias. Além disto, espécies com polinizadores especializados e fluxo gênico mantido a longas distâncias, como ocorre nas espécies de *Ficus*, a fragmentação e o isolamento físico não impedem a troca gênica, resultando em fertilização. Desta forma, ressalta-se a importância da conservação de remanescentes florestais, mesmo em paisagens muito fragmentadas.

ABSTRACT

Plant populations are experiencing reductions in their population sizes due to current destruction and fragmentation rates of tropical forests. Moreover, some plant species may be more affected by demographic stochasticity and genetic drift than others. Understand the effects of forest fragmentation on population genetics to drive strategies for species conservation in- and ex situ is essential. Species of the genus *Ficus* (Moraceae) are important in tropical forests by providing food resources to different groups of vertebrates and showing a mutualistic relationship with pollinating wasps. Natural populations of *Ficus citrifolia* P. Miller and *Ficus eximia* Schott, in fragments of semideciduous forests in São Paulo State (Parque Estadual Morro do Diabo - PEMD ~ 33,000 ha, Estação Ecológica de Caetetus - EEC ~ 2000 ha and Estação Ecológica de Ribeirão Preto, EERP ~ 200 ha) were sampled to assess whether both reduction and fragmentation of habitat leave to loss of diversity and changes in genetic structure in their populations. In order to broaden tools for studying population genetics, microsatellite markers developed for other *Ficus* species were transferred and characterized in *F. citrifolia* and *F. eximia*. Results showed that the habitat loss and fragmentation reduce allelic richness of *F. citrifolia* and *F. eximia* populations. In spite of this, *F. citrifolia* and *F. eximia* showed high genetic variability, no inbreeding, presence of rare and exclusive alleles in their population and high intrapopulation genetic variability. These results are due probably to the reproductive system of these species (allogamy) and the long-distance and species-specific agaonid wasp mediated pollination. Moreover, in species with specialized pollinators and long-distance gene flow, as observed in *Ficus*, fragmentation and habitat isolation do not prevent gene flow, resulting in fertilization. So, these results emphasize the importance of conservation of forest remnants, even in highly fragmented landscapes.



INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Efeitos genéticos da fragmentação florestal

A fragmentação florestal é a modificação de uma grande extensão de habitat em áreas menores, incluindo fragmentos de diferentes tamanhos, formas, grau de isolamento, tipo de vizinhança e histórico de alterações, o que compromete a conservação da diversidade biológica presente nestas áreas (Viana & Tabanez, 1996).

A avaliação das conseqüências da redução e isolamento de populações é fundamental para prever o destino de espécies em fragmentos florestais e para o planejamento efetivo de programas de manejo em pequenas áreas de floresta. Essa avaliação é uma tarefa complexa, porque o efeito da fragmentação pode se estender indiretamente por meio de uma rede de interações interespecíficas e a mais crítica dessas interações talvez seja aquela que afeta diretamente o sucesso reprodutivo das espécies (Dutech et al., 2005; Ward et al., 2005). O processo de polinização, por exemplo, pode ser interrompido pela fragmentação florestal, mediante efeitos diretos e indiretos nas plantas e polinizadores, resultando em prejuízos para as espécies vegetais, tais como redução e isolamento de populações de plantas e perda da variabilidade genética (Murcia, 1996).

Dessa forma, a destruição de habitats e a conseqüente fragmentação de populações naturais podem acarretar uma limitação evolutiva para as espécies que os compõem, devido à perda de variabilidade genética e à redução na capacidade de adaptação às mudanças ambientais (Young et al., 1996). Tais alterações se refletem nos processos de deriva genética, fluxo gênico, seleção e no sistema de cruzamentos (Couvet, 2002). Sendo esses processos determinantes do grau de diversidade genética na espécie, bem como sua distribuição entre indivíduos e populações, os principais efeitos genéticos da

fragmentação florestal são a diminuição da diversidade genética nas populações e espécies (Dayanandan et al., 1999; White et al., 1999), a mudança na estrutura genética populacional e o aumento da endogamia (Fuchs et al., 2003), que acarretam fortes prejuízos às populações de espécies florestais (Young et al., 1996).

Entretanto, as respostas das espécies vegetais ao processo de fragmentação são altamente variáveis, dependendo de suas características e das alterações ambientais ocorridas (Lowe et al., 2005). Em algumas espécies de plantas, por exemplo, foi observado que a fragmentação não levou ao aumento da divergência entre as populações, nem à redução na variação genética e heterozigosidade dentro de populações e nem nos níveis de fluxo gênico entre os fragmentos (Young et al., 1993; Sun, 1996; González-Astorga & Núñez-Farfán, 2001; White et al., 2002; Dick et al., 2003). No entanto, a diversidade genética e a estrutura podem ser alteradas se a fragmentação florestal modificar os padrões de dispersão de pólen e sementes (Foré et al., 1992).

Sendo assim, é preciso entender a dinâmica das populações nos remanescentes florestais e sua interação com os elementos da paisagem para que as práticas de manejo e conservação sejam eficientes. Em programas de conservação e manejo de populações, é importante conhecer as variações de diversidade genética e do fluxo gênico em populações causadas por fatores ecológicos e antrópicos. Dessa forma, ressalta-se que o entendimento da ecologia das espécies torna-se fundamental ao manejo e à conservação adequados, principalmente para espécies, como as figueiras (*Ficus*, família Moraceae), que apresentam interações específicas (Weiblen, 2002) e são importantes à resiliência de habitats alterados (Harrison, 2003).

1.2 Significado ecológico do gênero *Ficus*

O gênero pantropical *Ficus* é, dentro da família Moraceae, o mais diverso, com aproximadamente 800 espécies descritas (Berg, 1989). O centro de distribuição do gênero *Ficus* está na Ásia com mais de 500 espécies (Finkeldey, 2005). O gênero *Ficus* é caracterizado por sua inflorescência, o sicônio ou o figo (Figura 1; Verkerke, 1989). Os figos são fechados apicalmente por brácteas e apresentam formato de uma urna onde, no seu interior, estão inseridas centenas de flores (Verkerke, 1989). A propagação natural das figueiras ocorre por meio de uma forma extraordinária de polinização, intimamente relacionada às vespas que as polinizam e que, em contrapartida, são dependentes dos figos para completarem seu ciclo de vida.

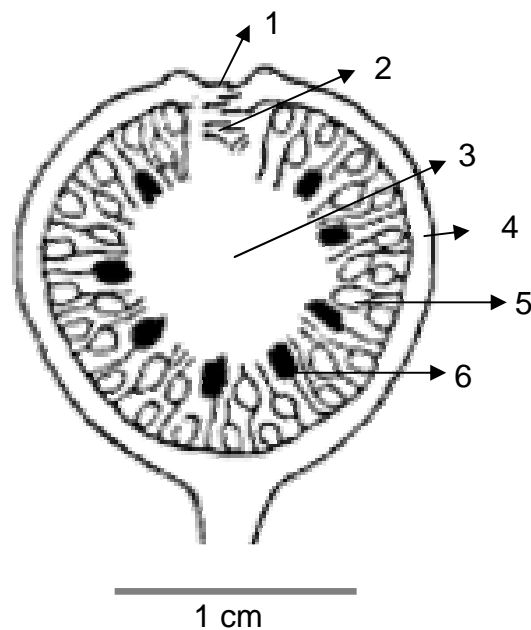


FIGURA 1 - Inflorescência do gênero *Ficus*, o sicônio ou figo, em forma de urna e aberta apicalmente pelo ostíolo (1) que é formado por um conjunto de brácteas (2) que dificultam a entrada de muitos organismos no lúmen do figo (3). Na parede do figo (4) estão inseridas as flores femininas (5) e as masculinas (6) que, nas espécies monóicas amadurecem algumas semanas após o surgimento das flores femininas caracterizando a protoginia. Modificado de Weiblen (2002).

A interação *Ficus* – vespas do figo é considerada um dos exemplos mais extremos de mutualismo entre planta e inseto, com evidências suficientes para ser enquadrada no conceito de co-evolução (Jousselin et al., 2003a; Weiblen, 2004). Em geral, a cada espécie de *Ficus* está associada uma espécie de vespa polinizadora específica da subfamília Agaoninae (Hymenoptera: Agaonidae; Ramirez, 1970); porém, estudos mais aprofundados mostram que exceções a essa especificidade parecem mais comuns do que se supunham (Compton, 1990; Molbo et al., 2003).

Em uma população de figueiras, a floração entre as plantas ocorre de maneira assincrônica ao longo do ano; porém, o desenvolvimento e a maturação dos figos em cada planta são normalmente sincronizados (Bronstein, 1992; Pereira et al., 2006). Quando os figos são jovens e as flores femininas estão receptivas, vespas fêmeas acasaladas e carregando pólen (fundadoras) são atraídas por substâncias voláteis emanadas do interior do figo (van Noort et al., 1989; Ware & Compton, 1994; Gibernau et al., 1997) penetrando-o através do ostíolo. Então, as fundadoras polinizam as flores femininas e depositam ovos nos ovários de algumas delas. Na seqüência, com poucas exceções, as fêmeas morrem no interior do figo e seus corpos permanecem no lúmen. Durante as semanas seguintes, frutos (aquênios) se desenvolvem nas flores polinizadas e larvas de vespas polinizadoras crescem em flores nas quais ovos foram depositados, formando galhas. Pouco antes do amadurecimento do figo, os machos emergem de suas galhas e vasculham o interior do figo em busca de galhas contendo vespas fêmeas. Os machos perfuram as galhas com suas mandíbulas, acasalam com as fêmeas antes de emergirem e abrem cavidades na parede do figo para o escape das vespas polinizadoras. Logo após o acasalamento, as fêmeas emergem das galhas, coletam (espécies com comportamento de polinização ativa) ou simplesmente recobrem seus corpos (espécies com polinização passiva; Jousselin et al., 2003a) com o pólen das flores masculinas

recém amadurecidas e abandonam o sicônio, recomeçando o ciclo em outra planta (Galil & Eisikowitch, 1968; Ramírez, 1970; Bronstein, 1992).

Galil & Eisikowitch (1968) dividiram o ciclo de desenvolvimento do figo e das vespas do figo em cinco fases (Figura 2): (1) pré-feminina, antes do amadurecimento das flores femininas; (2) feminina, quando as flores femininas estão receptivas a polinização e atrativas às vespas polinizadoras; (3) interfloral, quando os frutos e as larvas das vespas estão em desenvolvimento; (4) masculina, quando as anteras estão maduras e a prole adulta das vespas emerge de suas galhas e (5) pós-floral,

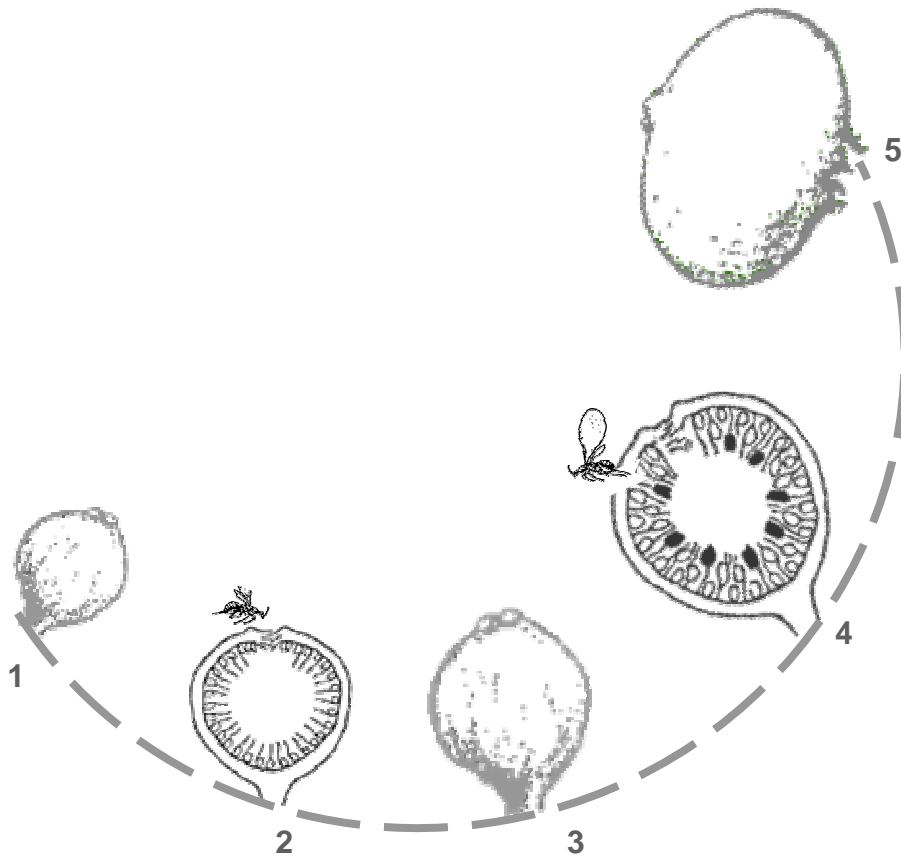


FIGURA 2 - Ciclo de desenvolvimento do figo e das vespas do figo nas fases: (1) pré-feminina, (2) feminina, (3) interfloral, (4) masculina e (5) pós-floral. Modificado de Ramírez (1970).

após a dispersão das fêmeas acasaladas e carregadas de pólen, os figos amadurecem e tornam-se atrativos a frugívoros. Nas florestas tropicais, os figos são recursos chave para uma diversa fauna que contribui para a sucessão florestal e à resiliência de áreas degradadas (Harrison, 2003).

1.3 A polinização em *Ficus*

As interações das plantas e seus polinizadores permitem a compreensão de processos ecológicos e evolutivos, sendo estas, uma das principais explicações para a alta riqueza de espécies arbóreas presentes nas florestas tropicais. Tais interações têm sido utilizadas como modelos em estudos de co-evolução, fluxo gênico, na estabilidade de comunidades e na evolução do sistema sexual de plantas (Bawa, 1990).

A reprodução em plantas pode ocorrer por auto-polinização, polinização cruzada ou sistema misto, sendo estes dependentes do sistema sexual da planta ou espécie (dioícia, monoícia, androdioicismo, ginodioicismo). A fecundação cruzada entre indivíduos diferentes (alogamia) é o modo de reprodução predominante nas comunidades vegetais tropicais sendo que 76% das espécies arbóreas apresentam este tipo de reprodução (Bawa, 1974). Em relação ao agente polinizador, predomina a zoofilia nas espécies arbóreas, sendo os insetos os principais polinizadores (Bawa, 1990).

Muitos insetos são polinizadores passivos, mas alguns grupos evoluíram mecanismos sofisticados de polinização ativa (Cook & Rasplus, 2003). Das interações entre plantas e polinizadores, as espécies de *Ficus* são as que apresentam mecanismo de polinização mais sofisticado (Jousselin et al., 2001). A polinização ativa em vespas de figo é caracterizada pela presença de estruturas morfológicas utilizadas para transporte (bolsos de pólen) e coleta (pentes coxais) de grãos de pólen (Kjellberg et al., 2001;

Weiblen, 2002; Nazareno et al., 2007). Cook et al. (2004) enfatizaram que na polinização ativa, no sistema *Ficus* – vespas de figo, alguns aspectos comportamentais devem ser identificados. As vespas devem coletar grãos de pólen, colocando-os dentro dos bolsos de pólen e depositando-os sobre as flores femininas receptivas utilizando, para isto, os pentes coxais. A perda de qualquer um dos comportamentos descaracteriza a polinização ativa. Estudos filogenéticos indicam que o mecanismo passivo de polinização é ancestral nas vespas de figo, mas em vários casos houve perdas secundárias do mecanismo ativo de polinização (Kjellberg et al., 2001; Jusselin et al., 2003a).

1.4 Consequências genéticas do mutualismo *Ficus* – vespas do figo

A auto-fecundação nas espécies monóicas de *Ficus* é, usualmente, excluída em função da forte protoginia e sincronia no desenvolvimento dos sicônios. As espécies ginodióicas de *Ficus* são funcionalmente dióicas e desta forma a auto-fecundação é também excluída. A estrutura genética de coortes em *Ficus* (progênies produzidas simultaneamente em uma mesma safra) é fortemente diferenciada dependendo do número de árvores doadoras de pólen e pelo número de vespas polinizadoras que colonizam um único figo. As flores de um figo são, geralmente, fertilizadas por poucas vespas e, desta forma, as progênies oriundas são, em grande maioria, irmãs-completas, *i.e.*, possuem o mesmo parentesco.

A frequência de reprodução de duas figueiras em uma mesma população é fortemente influenciada pela fenologia de florescimento e em menor grau, pela proximidade espacial em função da capacidade de dispersão a longas distâncias dos polinizadores (Finkeldey, 2005). Investigações genéticas sobre o parentesco de

sementes em sete espécies monóicas de *Ficus*, na América Central, revelaram que muitos dos aquênios desenvolvidos em um único figo foram fertilizados por pólen oriundos de diferentes árvores (Nason et al., 1996; 1998). Baseado nisso, o movimento de pólen para as espécies de *Ficus* estudadas, por estes autores, foi estimado em distâncias de 5,8 a 14,2 km. Estes resultados permitiram estimar a unidade reprodutiva, *i.e.*, área onde ocorrem trocas gênicas entre plantas, das espécies de *Ficus* que variou de 106 a 632 km². Áreas maiores que 100 km² nunca foram relatadas para qualquer espécie de planta investigada (Herre, 1996). Harrison (2003) enfatiza que o transporte de grãos de pólen é facilitado pela dispersão das vespas polinizadoras mediada por correntes de vento. Secundariamente, as substâncias voláteis atraem as vespas em distâncias curtas da árvore com figos receptivos (Ware & Compton, 1994b). Estes resultados indicam que as populações de figueiras, mesmo em paisagens fragmentadas, podem permanecer reprodutivamente viáveis devido à capacidade de vôo a longas distâncias por seus agentes polinizadores. Desta forma, conservar os fragmentos florestais se torna importante não só para a manutenção da diversidade genética das espécies de *Ficus*, mas também para a conservação de outras espécies ecologicamente relacionadas.

1.5 As espécies *Ficus citrifolia* P. Miller e *Ficus eximia* Schott.

Ficus Tourn. ex. Linn. é amplamente distribuído pelas regiões tropical e subtropical do velho e novo mundo, e algumas regiões de clima temperado (Berg, 1989). No entanto, pode-se considerar que o número de espécies supere 1000, considerando a ausência de identificação de novas espécies e a falta de coletas sistemáticas em algumas regiões (Carauta & Diaz, 2002). Na região neotropical ocorrem 130 espécies de figueiras, nos subgêneros *Urostigma* e *Pharmacosyceae*. O subgênero *Urostigma*, seção

Americana, compreende plantas monóicas que podem ocorrer nas formas de árvore e, freqüentemente, hemiepífita (Berg, 1989). Apresentando hábitos distintos e de ampla ocorrência, as espécies *Ficus citrifolia* (Figura 3, A-D) e *Ficus eximia* (Figura 3, E-G), ambas pertencentes ao subgênero *Urostigma*, foram estudadas nesse trabalho.

Ficus citrifolia é uma espécie de ampla distribuição geográfica ocorrendo nas Américas do Sul e Central e, desenvolve-se bem em ambientes degradados. A espécie tem grande plasticidade ambiental, desenvolvendo-se isoladamente no solo ou como hemi-epífita em outras espécies arbóreas ou sobre construções em centros urbanos. Aparentemente, caracteriza-se como espécie pioneira, sendo exigentes em luz, com ciclo de vida curto e reprodução inicial (L.F.M. Coelho & R.A.S. Pereira, dados não publicados).

Conhecida popularmente como figueira-brava, *F. eximia* é nativa do Brasil e ocorre nas regiões sul, sudeste, centro-oeste e norte brasileiros. Os indivíduos de *F. eximia* normalmente apresentam o hábito terrícola, crescendo diretamente sobre o solo ou, inicialmente, sobre troncos caídos, sendo mais abundante em locais mais úmidos (L.F.M. Coelho & R.A.S. Pereira, dados não publicados). Pode ser caracterizada como uma espécie secundária, tolerantes à luz, com longevidade acentuada e reprodução tardia.



FIGURA 3 - *Ficus citrifolia* P. Miller (A-D) e *Ficus eximia* Schott (E-G).

1.6 Estudos de diversidade genética com auxílio de marcadores

Marcadores moleculares vêm sendo utilizados em espécies florestais desde os anos de 1980, quando as isoenzimas permitiram realizar os primeiros estudos de sistemas de cruzamento em pomares de sementes e produzir as primeiras versões de mapas genéticos de coníferas (Adams & Joly, 1980).

A análise genética de espécies florestais progrediu com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgindo diversos métodos de detecção de polimorfismo genético no DNA, usando-se marcadores moleculares. O polimorfismo refere-se às diferenças nas seqüências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA observadas entre indivíduos (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para verificar a variabilidade genética, começando com os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) no final dos anos de 1980 e início dos anos de 1990 (Devey, 1991; Bradshaw, 1994; Byrne et al., 1995), em seguida pelos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Carlson et al., 1991; Grattapaglia & Sederoff, 1994), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Gaiotto et al., 1997; Marques et al., 1998), marcadores microssatélites (Rafalski et al., 1996) e, mais recentemente, polimorfismos de base individual (SNP) (Williams et al., 2000; Brown et al., 2004; Gonzales-Martinez et al., 2006a).

Estes marcadores podem diferir quanto o tipo de herança, a abundância dentro do genoma, o nível de polimorfismo e informação genética detectados, a especificidade dos locos, a reprodutibilidade, os requerimentos técnicos e o investimento financeiro (Buso et al., 2003).

Entre os marcadores moleculares, o mais adequado atualmente para estudos de estrutura genética populacional são os marcadores microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR), que se tornaram uma ferramenta útil na construção de mapas genéticos, em análise de paternidade, no fluxo gênico, no diagnóstico de doenças, na investigação forense, em estudos ecológicos e na biologia da conservação (Chase et al., 1996). Além disso, os marcadores microssatélites são os mais indicados nesses estudos, em razão de seu elevado conteúdo informativo, por sua robustez analítica, herança codominante e pelas altas taxas de transferibilidade entre espécies (Borém, 2007).

1.7 Marcadores microssatélites

Os microssatélites são marcadores baseados em seqüências curtas, de um a seis nucleotídeos, repetidas em série e com número variável encontradas no genoma dos organismos vivos. Esses marcadores apresentam uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração, constituindo a classe mais polimórfica de marcadores moleculares conhecidos na atualidade (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Eisen, 1999).

As mutações são causadas por alterações no número das unidades de repetição, sendo que a maioria dessas alterações resulta de mudanças no número integral de cópias das unidades de repetição (Eisen, 1999). Os modelos que explicam estas alterações são: (1) permuta desigual entre as cromátides, resultando na recombinação entre cromossomos homólogos que não foram alinhados corretamente e, (2) o deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA, que é o mais aceito, ocorrendo em regiões do DNA que contêm seqüências curtas repetidas em série, ocasionado por uma elevada taxa de erros de pareamento decorrentes do “escorregamento” da fita durante a replicação do DNA (Eisen, 1999).

As unidades de repetição dos microssatélites são geralmente mono, di, tri ou tetranucleotídeos. Muitos locos microssatélite estão localizados entre genes ou dentro de íntrons, sendo extremamente abundantes (Engel et al., 1996). Devido a esta distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem não sofrer ação da seleção natural, o que os tornam um marcador seletivamente neutro muito útil para estudos genéticos (Eisen, 1999).

Estes marcadores possuem todas as características desejáveis como co-dominância, *i.e.*, os alelos de um indivíduo heterozigoto são distinguíveis quando visualizados, neutralidade, multi-alelismo e estabilidade suficiente para serem utilizados em análises genéticas de populações tropicais (Zucchi, 2002; Brondani et al., 2003) e temperadas (Steinkellner et al., 1997).

Embora os microssatélites tenham se tornado uma ferramenta amplamente utilizada em estudos de mapeamento genético e de fluxo gênico, sua utilidade é limitada devido ao alto custo e tempo para o desenvolvimento de oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores) específicos. No Brasil, recentemente, iniciaram-se trabalhos de desenvolvimento de microssatélites visando à realização de estudos populacionais das espécies florestais *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 1999), *Swietenia macrophylla* (Lemes et al., 2002), *Ceiba petandra* (Brondani et al., 2003), *Oenocarpus bacaba* (Lepsch-Cunha et al., 2003), *Copaifera langsdorfii* (Gonela et al., 2005), *Eugenia uniflora* (Ferreira-Ramos et al., 2008) e *Cariniana estrellensis* (Guidugli et al., 2008).

No entanto, uma alternativa para eliminar o tempo e as despesas envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites para a espécie de interesse é a transferência de iniciadores heterólogos. A chance de sucesso na transferibilidade (amplificação heteróloga) de seqüências de DNA por reações de polimerização em cadeia (PCR) é inversamente relacionada à distância evolutiva entre as espécies (Zucchi, 2000). Foi

constatado que se pode conseguir uma eficiência superior a 50% em espécies que apresentam um tempo de divergência entre 15-25 milhões de anos (M.a.), comparada a 6,2% em um tempo de divergência entre 80-100 M.a., mas a eficiência na utilização está mais fortemente relacionada à taxa de evolução molecular do que ao tempo de divergência (Fitzsimmons et al., 1995).

Muitos estudos têm mostrado a possibilidade de transferibilidade de pares de iniciadores desenvolvidos para espécies pertencentes ao mesmo gênero (Cipriani et al., 1999; Yamamoto et al., 2001; Decroocq et al., 2003) ou entre diferentes gêneros (Roa et al., 2000). Marcadores microssatélites desenvolvidos para espécies de *Ficus* foram recentemente transferidos para vinte e três espécies do gênero, confirmando a aplicabilidade desses marcadores (Giraldo et al., 2005; Zavodna et al.; 2005a, Crozier et al., 2007). Destarte, propôs-se nesse estudo a transferência de marcadores microssatélites desenvolvidos para as espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* reduzindo o custo da pesquisa e fornecendo ferramentas informativas para a realização de estudos genéticos populacionais.

1.8 Diversidade e estrutura genética em populações de plantas

As florestas tropicais possuem grande diversidade de plantas com diferentes sistemas reprodutivos, associados às interações complexas com agentes polinizadores e dispersores de sementes (Oliveira & Gibbs, 2000; Machado & Lopes, 2004; Gross, 2005). A diversidade genética existente em populações naturais deve ser quantificada e avaliada quanto à distribuição entre e dentro de populações. A distribuição da diversidade genética pode apresentar grande variação por ser influenciada pelo tamanho efetivo populacional, pela ocorrência geográfica das espécies, pelo modo de reprodução,

pelo sistema de cruzamento e pelos mecanismos de dispersão de sementes (Bawa, 1992).

Espécies que apresentam sistema misto de reprodução ou preferencialmente alógamas e com mecanismos eficientes de dispersão de sementes e pólen deverão apresentar alta variabilidade genética dentro das populações e baixa entre elas (Berg & Hamrick, 1997; Ward et al., 2005). Já espécies com populações pequenas, de autofecundação e ou reprodução vegetativa, com dispersão limitada de pólen e sementes, deverão mostrar baixa variabilidade dentro e alta entre as populações (Loveless & Hamrick, 1984).

A distribuição dos alelos e dos genótipos no espaço e no tempo permite inferir a estrutura genética populacional. O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética ocorrem devido à variação do conjunto gênico, à organização desta variação dentro de genótipos, à distribuição espacial dos genótipos, ao sistema de reprodução que controla a união dos gametas para a formação das progênes, à seleção natural, à deriva genética, às taxas de mutação, aos eventos estocásticos e aos processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem às populações futuras (Hamrick, 1982). Os estudos de estrutura genética são fundamentados no teorema de Hardy-Weinberg. De acordo com este princípio, uma população de tamanho infinito e praticando cruzamentos ao acaso terá suas frequências gênicas e genotípicas constantes de geração à geração na ausência de migração, seleção e deriva. Este princípio permite o cálculo teórico da frequência de um determinado genótipo, independente do número de alelos existente (Futuyma, 1992).

Nesse sentido, o estudo da diversidade e da estrutura genética em populações arbóreas é importante para que se entenda como esta diversidade é distribuída e quais as características do ambiente ou da espécie que influenciam essa distribuição. A deriva

genética e o fluxo gênico restrito, por exemplo, provocam um acréscimo na endogamia promovendo um aumento da divergência genética entre populações (Hall et al., 1996). A endogamia pode levar à fixação de alelos recessivos deletérios, colocando em risco de extinção populações presentes em certos habitats (Young et al., 1996). Assim, tais estudos permitem auxiliar o manejo dos recursos genéticos, pois a manutenção da variabilidade genética em populações é a base da conservação de espécies (Yeoh et al., 1996) e, portanto, a sua descrição e distribuição é fundamental para o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas.

A caracterização da variabilidade genética dentro de populações é efetuada a partir de medições ou quantificações de diversidade intrapopulacionais, como a porcentagem de locos polimórficos (P), o número médio de alelos por loco (\hat{A}), o índice de fixação (f) e as heterozigosidades média observada (H_o) e esperada (H_e) (Berg & Hamrick, 1997). A caracterização da estrutura genética entre populações por marcadores codominantes pode ser abordada de três maneiras diferentes: a) estatísticas F de Wright (Wright, 1965), que permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), assim como dos níveis de endogamia ao nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}) (Yeoh et al., 1996; Moraes et al., 1999), b) análise da diversidade gênica em populações subdivididas (Nei, 1977), que fornece a proporção de variabilidade genética contida dentro e entre as populações e os níveis de heterozigosidade esperados para o total e média das populações (Lee et al., 2002; Gonzales & Hamrick, 2005) e c) coeficientes de co-ancestralidade de Cockerham (Cockerham, 1969; Weir, 1996), que possibilitam a avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia, além de possibilitar a obtenção de estimativas de endogamia, a partir de uma base não viesada (Botrel & Carvalho, 2004; Pinto & Carvalho, 2004). Segundo Reis (1996), as três

abordagens apresentam bases genéticas similares, porém, são complementares em relação ao significado biológico das estimativas obtidas.

2. OBJETIVO GERAL

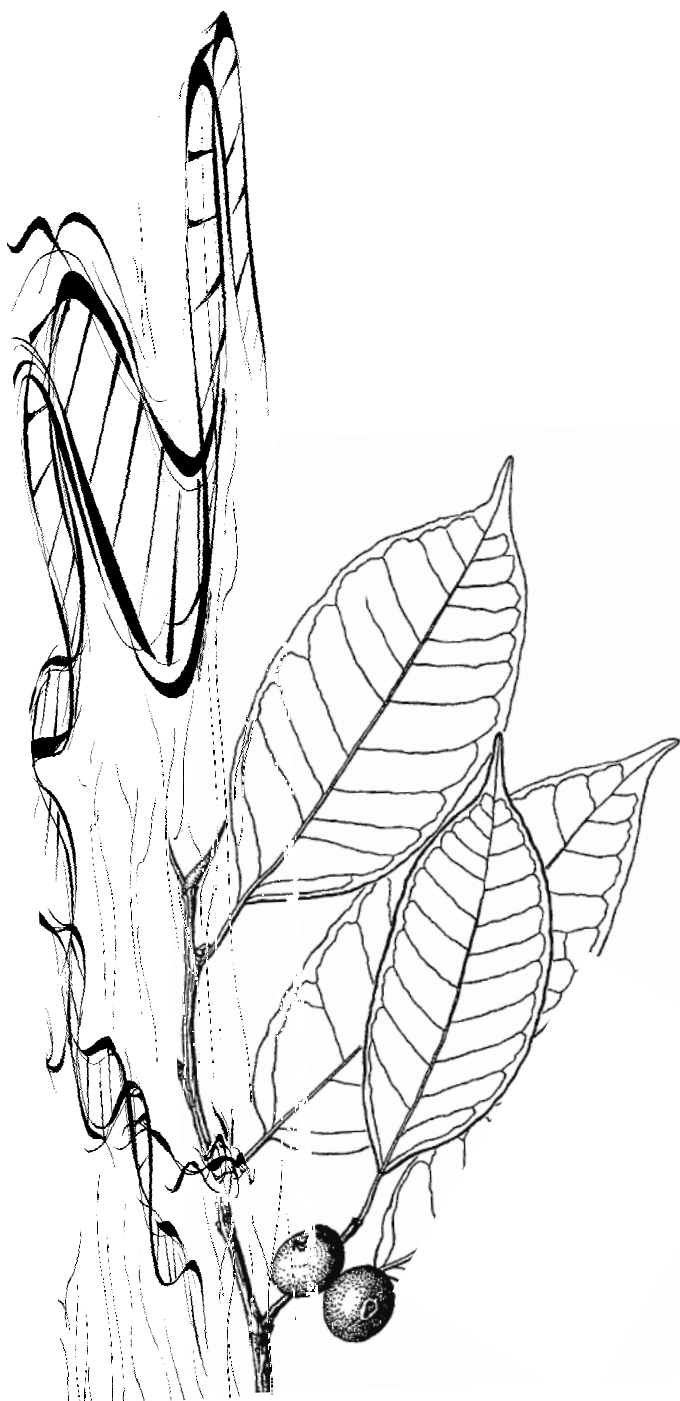
Este estudo teve por objetivo avaliar se a redução e a fragmentação de habitat podem causar perda de diversidade genética de populações naturais de *F. citrifolia* e *F. eximia* ocorrendo em áreas com histórico e intensidade de fragmentação diferenciados.

Como objetivos específicos, o estudo teve por finalidades:

- Transferir e caracterizar marcadores microssatélites para as espécies *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia*;
- Avaliar a variabilidade genética intra e inter-populacional;
- Caracterizar a estrutura genética das populações;
- Verificar se existe diferença nas estimativas de diversidade genética entre as espécies *F. citrifolia* e *F. eximia*;
- Sugerir medidas para a conservação dos recursos genéticos das espécies *F. citrifolia* e *F. eximia*.

3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Para facilitar o entendimento, a dissertação encontra-se dividida em dois capítulos. Cada trabalho foi tratado em capítulo, em que são apresentados os estudos de transferibilidade e caracterização de marcadores microssatélites para *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* (**Capítulo I**) e o uso desses marcadores, transferidos e caracterizados, para inferir sobre as conseqüências genéticas da fragmentação florestal em populações naturais de *F. citrifolia* e *F. eximia* (**Capítulo II**).



CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

Transferência e caracterização de marcadores microssatélites em *Ficus citrifolia* P.

Miller e *Ficus eximia* Schott

RESUMO

Os marcadores microssatélites são ferramentas informativas e podem ser usadas para avaliar a estrutura genética de populações e os índices de diversidade genética a partir das frequências alélicas. Com o intuito de obter uma ferramenta útil no estudo de genética populacional, minimizando custo e tempo despendidos, marcadores microssatélites desenvolvidos em espécies de *Ficus* foram transferidos e caracterizados em *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia*. Sessenta indivíduos de *F. citrifolia* e *F. eximia* foram coletados em duas populações (trinta indivíduos por população), localizadas no Estado de São Paulo: Parque Estadual Morro do Diabo e Estação Ecológica de Caetetus. O DNA dos indivíduos amostrados foi extraído e amplificado via reação de polimerização em cadeia (PCR). A transferência de marcadores microssatélites, previamente desenvolvidos para *F. insipida*, *F. montana*, *F. racemosa* e *F. rubiginosa*, foi testada em indivíduos de *F. citrifolia* e *F. eximia*. A caracterização dos locos transferidos para *F. citrifolia* e *F. eximia* foi avaliada pelos índices de diversidade genética: porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por loco (\hat{A}), heterozigosidade média observada (H_o) e heterozigosidade média esperada (H_e). Para *F. citrifolia*, dos 18 locos testados, 14 foram transferidos e 12 caracterizados. Para *Ficus eximia*, dos 18 locos testados, 13 foram transferidos e 12 caracterizados. Onze locos foram polimórficos quando caracterizados em 60 indivíduos de *F. citrifolia* e em 60 indivíduos de *F. eximia*. Em *F. citrifolia*, os locos mostraram de quatro a 15 alelos e a heterozigosidade esperada variou entre 0,31 e 0,91. Em *F. eximia*, foram observados dois a 12 alelos por loco e a heterozigosidade esperada variou entre 0,42 e 0,87. A taxa elevada de transferibilidade e o alto polimorfismo detectados indicam que esses marcadores são ferramentas aplicáveis em estudos de genética populacional de *F. citrifolia* e *F. eximia*.

ABSTRACT

Microsatellite markers are informative tools used to assess genetic structure of populations and estimate genetic diversity indices from allele frequencies. In order to broaden tools for studying population genetics, minimizing costs and time, microsatellite markers developed for other *Ficus* species were transferred and characterized in *Ficus citrifolia* and *Ficus eximia*. Sixty individuals of *F. citrifolia* and *F. eximia* were collected in two populations (thirty individuals per population), located in the São Paulo State: Parque Estadual Morro do Diabo and Estação Ecológica de Caetetus. DNA from sampled individuals was extracted and amplified by polymerase chain reaction (PCR). Microsatellite markers, previously developed to *F. insipida*, *F. montana*, *F. racemosa* and *F. rubiginosa*, were tested in individuals of *F. citrifolia* and *F. eximia*. The following variables related to genetic diversity were used to characterize the loci transferred to *F. citrifolia* and *F. eximia*: percentage of polymorphic loci (P), average number of alleles per locus (A), average observed heterozygosity (H_o) and average expected heterozygosity (H_e). For *F. citrifolia*, among 18 tested loci, 14 were transferred and 12 characterized. For *Ficus eximia*, among 18 tested loci, 13 were transferred and 12 characterized. Eleven loci were polymorphic when characterized in 60 individuals of *F. citrifolia* and 60 individuals of *F. eximia*. In *F. citrifolia*, loci showed four to 15 alleles and expected heterozygosity ranged between 0.31 and 0.91. In *F. eximia*, were observed two to 12 alleles per locus and expected heterozygosity ranged between 0.42 and 0.87. The high rate of transferability and high polymorphism markers indicate that these tools are suitable for population genetics studies of *F. citrifolia* and *F. eximia*.

1. INTRODUÇÃO

Estratégias efetivas para a conservação de recursos genéticos têm se tornado prioridade devido ao impacto negativo da redução e da fragmentação de habitat na diversidade biológica. No sentido de minimizar os efeitos da redução e fragmentação de habitat, o entendimento da ecologia e genética das espécies tornam-se fundamental ao manejo e à conservação adequados, principalmente para espécies como as figueiras (*Ficus*, Moraceae), que são consideradas recursos chave nas florestas tropicais (Shanahan et al., 2001). As plantas do gênero *Ficus* são, classicamente, conhecidas pelo seu sistema de polinização e pelo mutualismo que exerce com as vespas polinizadoras (Ramirez, 1970). Com poucas exceções, cada uma das 750 espécies de *Ficus* mantém uma interação simbiótica obrigatória com uma única espécie de vespa polinizadora (Hymenoptera: Agaonidae).

Pouco é conhecido, no entanto, sobre a diversidade genética e a estrutura populacional das espécies de *Ficus* (Dick et al., 2008). Atualmente, o uso das técnicas de biologia molecular vem permitindo avaliar a variabilidade genética existente em espécies florestais. Os marcadores microssatélites (sequências simples repetidas - SSR) são ferramentas informativas e podem ser usadas para avaliar a estrutura genética de populações e os índices de diversidade genética a partir das frequências alélicas. Embora os marcadores microssatélites constituam um sistema informativo para genética ecológica, eles foram isolados para menos de 1% das 750 espécies do gênero *Ficus* (Khadari et al., 2001; Giraldo et al., 2005; Zavodna et al., 2005a; Vignes et al., 2006; Ahmed et al., 2007; Bandelj et al., 2007; Crozier et al., 2007). No entanto, a alta transferibilidade destes marcadores já permitiram a amplificação em 53 espécies de *Ficus* (Khadari et al., 2001; Giraldo et al., 2005; Vignes et al., 2006). Outras pesquisas

também demonstraram altas taxas de transferibilidade de marcadores microssatélites dentro de um mesmo gênero (Poncet et al., 2004; Moon et al., 2008). Em vista do custo e do tempo despendido no isolamento de microssatélites, é então vantajoso a utilização de seqüências de iniciadores identificadas em espécies filogeneticamente próximas.

Os objetivos desse estudo foram transferir e caracterizar marcadores microssatélites, desenvolvidos para espécies pertencentes a diferentes subgêneros de *Ficus*, em duas espécies do gênero *Ficus* nativas do Brasil: *Ficus citrifolia* P. Miller e *Ficus eximia* Schott.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Espécies e local de estudo

O subgênero *Urostigma*, seção *Americana* ao qual *F. citrifolia* e *F. eximia* pertencem compreendem plantas monóicas que podem ocorrer como arbóreas ou hemi-epífitas (Berg, 1989). *Ficus citrifolia*, normalmente, cresce como hemi-epífita em outras árvores ou construções e, frequentemente se desenvolve em áreas degradadas. *Ficus eximia*, usualmente, germina em troncos caídos e cresce como arborea em locais úmidos nas florestas. Durante os meses de janeiro e fevereiro de 2008, foram amostrados 120 indivíduos de *F. citrifolia* e *F. eximia* em duas populações (30 indivíduos por local e por espécie) localizadas no Parque Estadual Morro do Diabo (22°27' - 22°40'S, 52°10' - 52°22'O) e na Estação Ecológica de Caetetus (22°41' - 22°46'S, 49°10' - 49°16'O), ambas no sudeste brasileiro.

2.2 Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA das folhas dos indivíduos de *F. citrifolia* e *F. eximia* foi efetuada com base na metodologia de Doyle & Doyle (1990) modificada por Alzate-Marin et al. (2005). Trezentos miligramas de tecido foliar, por planta, foram macerados em cadinhos de porcelana contendo 800 μ L de tampão de extração (2 % CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 % PVP sólido), previamente aquecido a 65 °C. Após a maceração, o material foi transferido para tubos *Eppendorf* de 1,7 mL, aos quais foram adicionados 0,2% β -Mercaptoetanol, e mantidos a 65°C por 30 minutos em banho-maria, com agitações periódicas.

Após a retirada dos tubos do banho-maria, realizou-se uma etapa de separação (eliminação das proteínas) com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguida pela homogeneização das amostras por inversões suaves durante 10 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.200 rotações por minuto (rpm) em centrífuga *Eppendorf* modelo 5415R, recuperando cerca de 500 μ L do sobrenadante, os quais foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL.

RNAse (40 μ g/mL) foi adicionada ao sobrenadante, procedendo-se a incubação em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se isopropanol gelado na proporção 1:1 (isopropanol:sobrenadante) e as amostras foram armazenadas a -20 °C durante no mínimo 30 minutos para ocorrer a precipitação do DNA. Após esse período, centrifugou-se as amostras a 13.200 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado submetido a duas lavagens com etanol para a retirada do excesso de sal. O DNA extraído foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido com TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro modelo *Spectronic Genesys 5*, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de TE, no comprimento de onda 260 nm. Para estimar a quantidade de DNA, tomou-se como referência que uma unidade de densidade óptica (50 µg de DNA por mL; Sambrook et al., 1989) aplicando a seguinte fórmula:

$$[DNA]_{\mu\text{g}/\mu\text{L}} = (A_{260} \times \text{DO} \times f) / 1000, \text{ onde:}$$

A_{260} = absorbância sob luz UV no comprimento de onda 260 nm;

DO = unidade de densidade óptica (50 µg/mL);

f = 8,33 (fator de diluição).

2.3 Transferibilidade de marcadores microssatélites

Neste estudo foi utilizado um conjunto de 18 pares de marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos para *Ficus insipida*, *F. montana*, *F. rubiginosa* e *F. racemosa* (Tabela 1). Temperaturas variando de 46 a 55 °C foram testadas, para cada marcador, para se obter a temperatura ótima de anelamento dos iniciadores. Os testes de transferibilidade foram realizados em 10 indivíduos de *F. citrifolia* e em 10 indivíduos de *F. eximia*.

TABELA 1. Marcadores SSR testados; número de acesso ao GenBank, produto de amplificação esperado em pares de base (pb) e temperatura de anelamento (T_a °C) padronizada nas espécies *Ficus insipida* (Fins)^a, *Ficus montana* (Fmo)^b, *Ficus racemosa* (Frac)^c e *Ficus rubiginosa* (Frub)^c.

<i>Locos SSR</i>	<i>Acesso GenBank</i>	<i>Produto esperado (pb)</i>	<i>T_a °C</i>
FinsT7	AM039810	193	55
FinsN1	AM039805	150	55
FinsU9	AM039811	148	54
FinsQ6	AM039809	98	55
Fmo27	AJ854074	314	55
Frac86	DQ659281	153	50
Frac110	DQ659282	166	50
Frac154	DQ659284	147	50
Frub29	DQ659290	188	50
Frub38	DQ659291	195	50
Frub61	DQ659292	145	50
Frub93	DQ659293	106	50
Frub391	DQ659294	149	50
Frub412	DQ659296	215	50
Frub415	DQ659297	150	50
Frub416	DQ659289	228	50
Frub422	DQ659298	172	50
Frub436	DQ659299	135	50

^a Marcadores SSR desenvolvidos para *Ficus insipida* por Vignes et al. 2006; ^b marcador SSR desenvolvido para *Ficus montana* por Zavodna et al. 2005a; ^c marcadores SSR desenvolvidos para *Ficus racemosa* e *Ficus rubiginosa* por Crozier et al. 2007.

2.4 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

As reações de polimerização em cadeia (PCR) foram realizadas utilizando o termociclador *Mastercycler Eppendorf*®. As condições das reações de amplificação do DNA de *F. citrifolia* e *F. eximia* foram padronizadas e os testes de amplificação foram

realizados em um volume final de 10 µl. Com exceção do DNA, todos os reagentes (tampão, dNTP, iniciadores – solução de trabalho, MgCl₂ e a Taq - DNA polimerase) foram misturados em quantidades específicas para cada loco em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações. O programa usado para amplificar os locos microssatélites foi: 96 °C por 5 minutos; 30 ciclos desnaturação a 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica de cada iniciador (*T_a*) por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e, extensão final a 72°C por 7 minutos.

2.5 Determinação dos produtos amplificados

A quantificação do tamanho dos alelos, em pares de base, foi realizada utilizando-se um marcador de peso molecular de 10 pares de base (Invitrogen).

2.6 A eletroforese

O produto amplificado foi separado por eletroforese vertical em géis de poli(acrilamida) desnaturantes e não desnaturantes. O tempo de corrida eletroforética foi padronizado para cada loco SSR.

Os géis desnaturantes, específicos para cada loco, foram feitos dissolvendo a uréia com a solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) e água em banho-maria a 50 °C, antes da adição do TBE, que foi adicionado apenas após o resfriamento da solução.

Os catalisadores da reação de polimerização do gel, TEMED e persulfato de potássio foram adicionados à mistura do gel imediatamente antes de verter a mistura em um cassete previamente montado, composto de duas placas de vidro separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos. Logo após a mistura de gel ter sido

vertida, colocava-se um pente de teflon na borda superior, formando poços no gel, onde posteriormente foram aplicadas as amostras de DNA amplificado, aguardando-se a polimerização do gel por no mínimo 30 minutos.

Após a polimerização dos géis, retirou-se o pente e os poços foram lavados com água. Os géis polimerizados foram montados em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE (1X) para cubas, em ambos os pólos (porção superior e inferior). A cuba foi conectada a uma fonte elétrica (*Amershan Pharmacia Biotech* - EPS 1001) ajustada à corrente elétrica necessária para a separação dos fragmentos amplificados. Foi realizada uma pré-corrída de pelo menos 10 minutos, em que as cubas com os géis foram ligadas à fonte elétrica. Após a pré-corrída, a fonte foi desligada e as amostras foram aplicadas nos poços.

Antes da aplicação das amostras nos géis desnaturantes, os fragmentos amplificados foram submetidos às condições desnaturantes com formamida, substância que auxilia no processo de desnaturação das amostras. Para tanto, foram colocados 7 μ L de tampão de amostra desnaturante (900 μ L de bromofenol, 900 μ L xilenocianol, 900 μ L TBE (10X), 4,5 mL de Ficol 30 % diluído em água destilada, 1,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 3,6 g de sacarose; na proporção de 3:1 com formamida) em um tubo *Eppendorf*, junto com 5 μ L do produto amplificado. Estes tubos foram aquecidos a 94 °C por 7 minutos e, em seguida, colocados em gelo (tratamento desnaturante), onde permaneceram até o final da aplicação das amostras no gel de poliacrilamida.

Quando o objetivo da eletroforese era somente verificar a região de amplificação dos fragmentos, foi utilizado um gel não desnaturante 10%, no qual não foi necessário tratamento desnaturante, sendo aplicados 5 μ L de amostra e 7 μ L de tampão de amostra, seguindo-se a aplicação no gel de poliacrilamida.

Após a aplicação das amostras, as fontes foram novamente ligadas e prosseguiu-se a eletroforese. Com o término da eletroforese, o gel foi retirado das placas de vidro e submetido aos procedimentos de coloração.

2.7 Coloração do gel com nitrato de prata e secagem

A coloração do gel foi feita de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti et al. (1994). Após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200 mL de solução fixadora (160 mL de etanol, 7,0 mL de ácido acético glacial e 833 mL de água), em seguida adicionou-se 3,0 mL de solução de nitrato de prata (2 g de nitrato de prata dissolvidos em 10 mL de água destilada) e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água a 50 °C por 10 segundos. Após o descarte da água, adicionou-se 200 mL de solução reveladora (22 g de NaOH em 1 L de água), vertida cuidadosamente no recipiente contendo o gel juntamente com 1,5 mL de formaldeído, sendo submetido à agitação por alguns minutos até que os alelos aparecessem nitidamente. Posteriormente à revelação, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 200 mL de solução fixadora. Ao final do processo de revelação dos fragmentos amplificados (alelos), os géis foram secos em papel celofane para posterior análise.

2.8 Análise dos dados

Os genótipos de cada indivíduo foram determinados pela leitura dos fragmentos nos géis, possibilitando estimar os parâmetros que caracterizam a variabilidade genética dos indivíduos de *F. citrifolia* e *F. eximia* amostrados.

2.8.1 Análise do desequilíbrio de ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Weir, 1979), usando o programa Genetic Data Analyses (GDA; Lewis & Zaykin, 2000). A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows é a mais indicada em situações em que a união de gametas pode ter ocorrido de forma não aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir, 1979). A hipótese de segregação independente foi testada com o teste qui-quadrado descrito por Weir (1979).

2.8.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

O teorema de Hardy-Weinberg é baseado em premissas que estabelecem que as frequências alélicas e genóticas permanecem constantes de geração à geração em uma população infinita, panmítica e na ausência de seleção, mutação, migração e deriva genética. Violações dessas premissas causam alterações nas frequências dos alelos, dos genótipos ou de ambos (Futuyma, 1992). As discrepâncias entre uma população “ideal” de Hardy-Weinberg e as populações reais são essenciais à evolução. Para testar a hipótese que as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizou-se o teste exato de Fisher pelo programa GDA (Lewis & Zaykin, 2000).

2.8.3 Caracterização da variação genética

As frequências alélicas e genotípicas de cada loco foram obtidas a partir da leitura dos fragmentos obtidos nos géis e estimadas por contagem direta e, as análises foram feitas utilizando-se o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000). A caracterização genética de *F. citrifolia* e *F. eximia* foi avaliada pelo número médio de alelos por loco (A), pelo número de locos polimórficos (P) e pelas heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) para o conjunto dos indivíduos amostrados nas populações do Parque Estadual Morro do Diabo e da Estação Ecológica de Caetetus. A probabilidade de exclusão de paternidade, considerando todos os loco, foi estimada utilizando o programa Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que marcadores microssatélites desenvolvidos para diferentes subgêneros de *Ficus* pôde ser transferidos e caracterizados em *F. citrifolia* e *F. eximia*. Para *F. citrifolia*, foram transferidos 14 marcadores microssatélites (Tabela 2) e destes, 12 foram caracterizados (Tabela 3). Para *F. eximia*, foram transferidos 13 marcadores microssatélites (Tabela 2) e destes, 12 foram caracterizados (Tabela 3).

A maioria dos marcadores microssatélites mostrou número de alelos e produtos amplificados similares aos das espécies nas quais eles foram desenvolvidos (Tabela 3). Dos 12 locos transferidos e caracterizados, 11 foram polimórficos em ambas as espécies, *F. citrifolia* e *F. eximia*. O loco FinsT7 foi monomórfico em *F. citrifolia* e o loco Frub154 foi monomórfico em *F. eximia*. Os locos monomórficos foram caracterizados por apresentar alelo com frequência superior a 95%.

TABELA 2. Locos microssatélites desenvolvidos para *Ficus insipida* (Fins), *Ficus montana* (Fmo), *Ficus rubiginosa* (Frub) e *Ficus racemosa* (Frac) e transferidos (+) para *Ficus citrifolia* e para *Ficus eximia*.

Locos	<i>Ficus citrifolia</i>	<i>Ficus eximia</i>
FinsT7	+	+
FinsN1	+	+
FinsU9	-	-
FinsQ6	+	+
Fmo027	-	-
Frac086	+	+
Frac110	-	-
Frac154	+	+
Frub29	+	+
Frub38	+	+
Frub61	+	+
Frub93	-	-
Frub391	+	+
Frub412	+	-
Frub415	+	+
Frub416	+	+
Frub422	+	+
Frub436	+	+

Um total de 87 alelos foram identificados para *F. citrifolia* e 77 para *F. eximia* (Tabela 3). A heterozigosidade média esperada e o número médio de alelos por loco foram 0,67 e 7,3 em *F. citrifolia* e 0,69 e 6,4 em *F. eximia*. Os valores das heterozigosidades para *F. citrifolia* e *F. eximia* observados neste estudo estão de acordo com os valores relatados para outras espécies do gênero *Ficus* (Bandelj et al., 2007; Crozier et al., 2007).

O nível de heterozigosidade encontrada em populações naturais depende do sistema reprodutivo, da história evolutiva das espécies, de fatores ecológicos (e.g., fluxo gênico,

sistema de polinização) e de processos demográficos (*e.g.*, densidade populacional, taxa de recrutamento). Embora diferentes marcadores microssatélites e tamanhos amostrais têm sido utilizados em estudos de diversidade genética em espécies de *Ficus*, os valores encontrados são coerentes com o esperado para espécies arbóreas que apresentam fluxo gênico a longas distâncias e sistema de polinização específico (Bawa, 1990). O fluxo gênico, via pólen e diásporos, nas espécies de *Ficus* é mantido a longas distâncias (Kinnaird et al., 1996; Nason et al., 1996; Nazareno & Carvalho, 2009), sugerindo que o comportamento dos polinizadores e dispersores podem prever os altos níveis de diversidade genética nestas espécies (Hamrick & Loveless, 1989; Epperson & Alvarez-Buylla, 1997).

Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram observados em sete locos para *F. citrifolia*. Em *F. eximia*, nove locos não estão em EHW (Tabela 3). Estes desvios podem indicar subestruturação populacional produzida pela amostragem ou pela presença de alelos nulos, uma vez que análises realizadas em nível populacional mostraram desvios do EHW para os mesmo locos. Além disso, quando é feita a transferibilidade de marcadores microssatélites a probabilidade de ocorrência de alelos nulos é maior nessas espécies do que nas espécies em que os marcadores foram desenvolvidos (Kim et al., 2004). A presença de alelos nulos é devido a alterações em uma ou em ambas as regiões de anelamento dos iniciadores no DNA) acarretando em erros na caracterização dos indivíduos, *i.e.*, indivíduos heterozigotos são caracterizados como homozigotos na presença de alelos nulos.

O teste qui-quadrado utilizado para testar a hipótese de segregação independente dos locos indicou que todos os locos de *F. citrifolia* estão em equilíbrio de ligação. Para *F. eximia*, no entanto, desequilíbrio de ligação significativo foi encontrado apenas entre o par de locos Frub38 e Frub415.

Os valores de probabilidade de exclusão sobre os 11 locos polimórficos foram 0,996 para *F. citrifolia* e 0,995 para *F. eximia* (Tabela 3). Usando estes 11 locos foi possível distinguir geneticamente todos os 60 indivíduos de *F. citrifolia* e os 60 indivíduos de *F. eximia* amostrados nas duas populações. Desta forma, os marcadores microssatélites transferidos podem ser usados em estudos de parentesco em populações naturais mesmo em situações em que o genótipo da árvore paterna ou materna é desconhecido. Neste sentido, ressalta-se que os marcadores transferidos e caracterizados para *F. citrifolia* e *F. eximia* são ferramentas ideais para estudos de genética de populações.

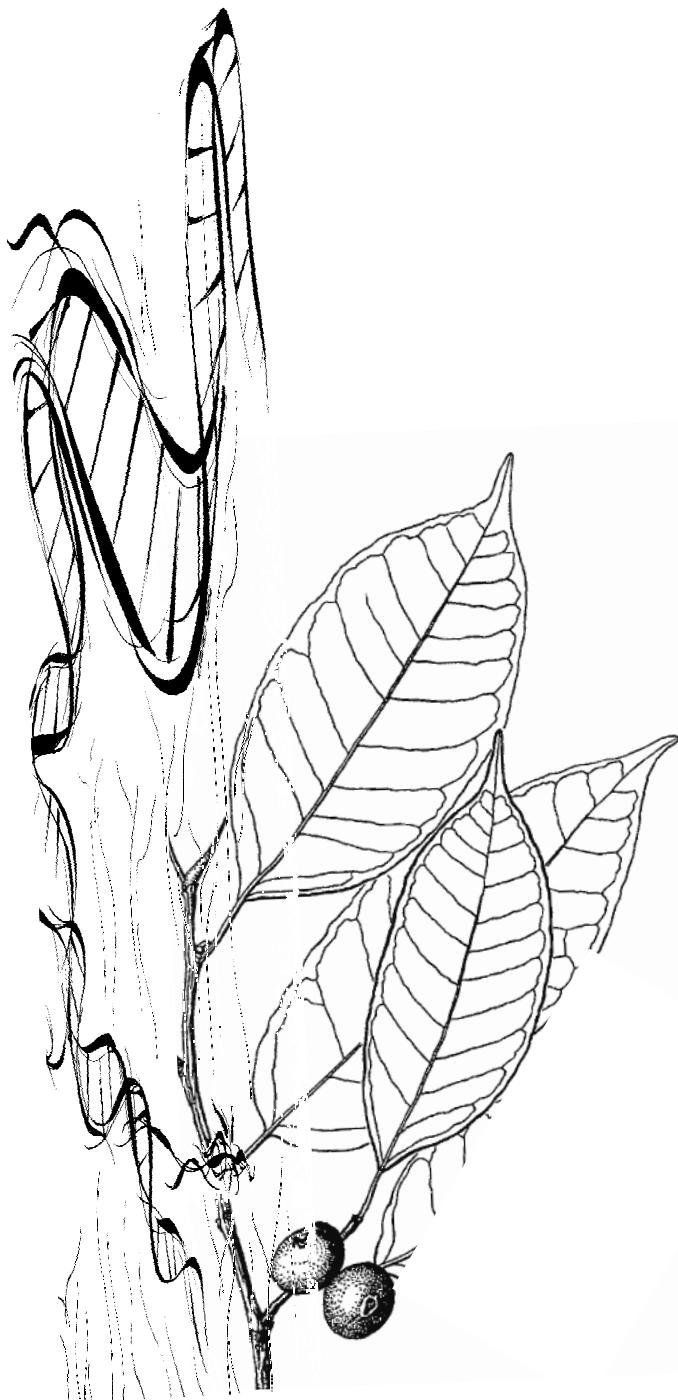
4. CONCLUSÃO

A alta taxa de transferibilidade dos marcadores microssatélites para *F. citrifolia* e *F. eximia* e a caracterização destes marcadores nestas espécies confirmam a aplicabilidade geral dos marcadores microssatélites desenvolvidos em *Ficus* para outras espécies deste amplo gênero.

TABELA 3. Caracterização dos marcadores microssatélites transferidos para 60 indivíduos de *Ficus citrifolia* e para 60 indivíduos de *Ficus eximia* amostrados nas populações do Parque Estadual Morro do Diabo e na Estação Ecológica de Caetetus no interior do Estado de São Paulo.

Loco Nº. Acesso	Iniciador Sequência 5'-3'	Repetição	Amplitude de tamanho (PB)	Caracterização de marcadores microssatélites									
				<i>Ficus citrifolia</i>					<i>Ficus eximia</i>				
				pb _o	N _a	T _a	H _o /H _E	Pe	pb _o	N _a	T _a	H _o /H _E	Pe
FinsN1 AM039805	F: AGGGCTGAGATAGGTTGATT R: TAAGTTGGTGTGTGGCATC	(TA) ₂ (CA) ₁₀ (TA) ₇ CATA(TG) ₂	150-160	151-160	4	50	0,93/0,68 ‡	0,248	158-164	4	49	0,93/0,66 ‡	0,231
FinsT7 AM039810	F: GAATCTGGAGGTGGAATAAAC R: AAAGATCGCTCGTCAACC	(TA) ₁₁ (TG) ₁₆	193-210	172-182	5	46	0,17/0,31 ‡	0,051	178	1	50	*	-
Frac86 DQ659281	F: TGTCACCTGTCTGTTGTGTC R: CAGCCAACCCTCAAGTATAAGA	(TC) ₁₃ (CA) ₁₀	153-167	166-196	15	46	0,90/0,91	0,662	162-178	8	50	0,25/0,83 ‡	0,466
Frac154 DQ659284	F: ACCCAAGAGCCCAAACTCGT R: TCAACCCTTGTGCTCCTTGC	(AC) ₁₃	147-151	140	1	48	*	-	144-159	6	48	1,00/0,78 ‡	0,380
Frub29 DQ659290	F: CCACTTTGGAATGTCACCTGGA R: TGAACACGCCAACTGAGAATG	(AG) ₂₄	188-226	186-228	8	48	0,73/0,78	0,399	195-255	12	50	0,72/0,87 ‡	0,577
Frub38 DQ659291	F: ACACGTGCAGTGTGCTGCTGA R: ACAGCTGCCCAATTCCTTGA	(AG) ₈ AAC(GA) ₁₃	195-255	190-220	6	50	0,67/0,77	0,359	192-222	7	49	0,36/0,78 ‡	0,383
Frub61 DQ659292	F: GTACACTCTCTTAGCTGCC R: GTACACTCTCTTAGCTGCC	(TC) ₂₄	145-188	130-178	12	50	0,55/0,82 ‡	0,468	120-165	11	50	0,64/0,87 ‡	0,561
Frub391 Q659294	F: AGATGTCAAATAAGGTCAGCT R: AGATGCAGTTCCATACAATTC	(TG) ₁₉	149-173	136-158	9	49	0,46/0,83 ‡	0,485	140-156	5	50	0,95/0,77 ‡	0,352
Frub415 DQ659297	F: GCACGTAGTCCGGTGTAAAGC R: CTGTGCGGAATAAAAAGCTAGC	(AC) ₁₀	150-173	132-156	4	50	0,58/0,54	0,141	158-164	2	48	0,39/0,42	0,087
Frub416 DQ 659289	F: CAGCAATGATCTTGACCT R: ACTCATCAATATCTCTAAACAAC	(CA) ₁₄ ... (CA) ₈	228-246	212-232	6	49	1,00/0,79 ‡	0,391	215-230	4	49	0,93/0,64 ‡	0,216
Frub422 DQ 659298	F: GCGTGAAATTTATGCTATGA R: GTTTCGTTCAATTTGAGTGC	(AC) ₁₈	172-190	155-176	8	49	0,48/0,80 ‡	0,426	156-170	8	49	0,70/0,79	0,407
Frub436 DQ 659299	F: GTACTGTGATTAGTATCTTTGA R CTAGCAATAACTCACTGATATTG	(AC) ₂₂	135-159	133-178	9	48	0,55/0,83 ‡	0,478	148-188	9	48	0,53/0,82 ‡	0,462
Soma ¹ /Média ² /Probabilidade de exclusão de paternidade ³						87 ¹ /7,3 ²	0,58 ² /0,67 ²	0,996 ³		77 ¹ /6,4 ²	0,62 ² /0,69 ²	0,995 ³	

pb_o, Amplitude de tamanho observado; N_a, número de alelos; T_a, Temperatura de anelamento (°C); H_o, Heterozigosidade observada; H_E, Heterozigosidade esperada; Pe, Probabilidade de exclusão de paternidade; *, FinsT7 e Frac154 são locos monomórficos; ‡, Desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weiberg ($P < 0,05$).



CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

**Estrutura e diversidade genética de populações naturais de *Ficus* spp. (Moraceae)
em fragmentos florestais no Estado de São Paulo**

RESUMO

Predições sobre as conseqüências genéticas da fragmentação florestal apontam para a redução do tamanho e o isolamento espacial de populações naturais. Teoricamente, tais mudanças alteram a variação e a divergência genética entre populações em função da deriva genética, da endogamia e do fluxo gênico restrito. Esses efeitos podem ter implicações para a persistência de espécies acarretando em perda de biodiversidade. Isto é mais agravante para espécies que exercem relações estreitas com outros organismos. As espécies do gênero *Ficus* (Moraceae) são importantes nas florestas tropicais por fornecerem recursos alimentares a diversos grupos de vertebrados e por estabelecerem mutualismo com vespas polinizadoras. Populações naturais de *Ficus citrifolia* P. Miller e *Ficus eximia* Schott, em fragmentos de florestas semidecíduas no Estado de São Paulo (Parque Estadual Morro do Diabo - PEMD ~ 33.000 ha, Estação Ecológica Caetetus - EEC ~ 2.000 ha e Estação Ecológica de Ribeirão Preto - EERP ~ 200 ha), foram amostradas para avaliar se a redução e a fragmentação de habitat podem causar perda de diversidade e modificações na estrutura genética em suas populações. Parâmetros genéticos populacionais foram obtidos utilizando-se 11 marcadores microssatélites nos indivíduos amostrados (média de 45 indivíduos/espécie/área). Os resultados indicam que a perda e a fragmentação de habitat reduzem a riqueza alélica de *F. citrifolia* e *F. eximia*. No entanto, *F. citrifolia* e *F. eximia* apresentam elevada variabilidade genética, ausência de endogamia e presença de alelos raros e exclusivos em suas populações. Análises da estrutura genética, baseadas nas frequências alélicas, indicam que a maior parte da diversidade genética de *F. citrifolia* e *F. eximia* encontra-se dentro de suas populações, apresentando maior divergência genética entre as populações do PEMD e EERP. A alteração aparente na diversidade genética entre as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* sugere que a deriva genética atua em populações menores como a da EERP. Por outro lado, a ausência de endogamia é um indicativo que a biologia reprodutiva de *F. citrifolia* e *F. eximia* pode ser o principal fator que mantém suas populações diversas geneticamente. A alogamia nas espécies de *Ficus* é, aparentemente, obrigatória, e a auto-fecundação é excluída em função da sua história natural. Além disto, para espécies com polinizadores especializados e fluxo gênico mantido a longas distâncias, como ocorre nas espécies de *Ficus*, a fragmentação e o isolamento físico têm menores pesos na diminuição da troca gênica. Desta forma, ressalta-se a importância da conservação de remanescentes florestais, mesmo em paisagens muito fragmentadas.

ABSTRACT

Predictions about genetic consequences of forest fragmentation point toward reduction and spatial isolation of natural populations. In theory, these changes affect genetic variation and divergence among populations in terms of genetic drift, inbreeding and restricted gene flow. These effects may affect the persistence of species, leading to loss of biodiversity. This effect may be stronger in organisms involved at close interspecific relationships. Species of genus *Ficus* (Moraceae) are important in tropical forests by providing food resources for different groups of vertebrates and showing a mutualistic relationship with pollinating wasps. Natural populations of *Ficus citrifolia* P. Miller and *Ficus eximia* Schott, in fragments of semideciduous forests in São Paulo State (Parque Estadual Morro do Diabo - PEMD ~ 33,000 ha, Estação Ecológica de Caetetus - EEC ~ 2000 ha and Estação Ecológica de Ribeirão Preto, EERP ~ 200 ha) were sampled to assess whether both reduction and fragmentation of habitat leave to loss of diversity and changes in genetic structure in their populations. Population genetic parameters were estimated by using 11 microsatellite markers in the sampled individuals (average of 45 individuals / species / area). Results showed that the habitat loss and fragmentation reduce allelic richness of *F. citrifolia* and *F. eximia* populations. In spite of this, *F. citrifolia* and *F. eximia* showed high genetic variability, no inbreeding, presence of rare and exclusive alleles in their population. Analysis of genetic structure, based on allele frequencies, indicated that genetic diversity of *F. citrifolia* and *F. eximia* occur mostly within populations. Populations from PEMD and EERP showed the highest genetic divergence between themselves. Changes in genetic diversity between populations of *F. citrifolia* and *F. eximia* suggest that genetic drift may act in small populations such as EERP. Moreover, the absence of inbreeding suggests that reproductive biology of *F. citrifolia* and *F. eximia* favors to keep their populations in high levels of genetic diversity. Natural history of *Ficus* species imposes an allogamous reproductive system and avoids self-fertilization. Moreover, in species with specialized pollinators and long-distance gene flow, as observed in *Ficus*, fragmentation and habitat isolation do not prevent gene flow, resulting in fertilization. So, these results emphasize the importance of conservation of forest remnants, even in highly fragmented landscapes.

1. INTRODUÇÃO

A conservação dos recursos genéticos florestais tem se tornado prioridade, principalmente, pelos impactos negativos na funcionalidade e composição dos ecossistemas ocasionados pelo aumento da população humana e de suas atividades econômicas (Laurance et al., 2006). No Brasil, cerca de 1,7 milhões de hectares de florestas são perdidos anualmente (Wright, 2005). A fragmentação e a redução de habitat resultando em remanescentes florestais menores e isolados representam uma séria ameaça à biodiversidade (Young et al., 1996).

Teoricamente, mudanças populacionais associadas com a degradação e redução de habitat levariam a erosão da variação genética e aumento da divergência genética interpopulacional em função da deriva genética, da endogamia e do reduzido fluxo gênico (Ellstrand & Elam, 1993, Lowe et al., 2005, Jump & Peñuelas, 2006). Para as espécies neotropicais, a redução do habitat é, geralmente, equivalente a redução do tamanho populacional (Lowe et al., 2005). Populações pequenas nos remanescentes florestais estão, portanto, mais susceptíveis aos efeitos genéticos da fragmentação florestal (Ellstrand & Elam, 1993). No entanto, a longevidade das espécies florestais combinada com a dispersão efetiva de pólen e semente podem amenizar esses efeitos (Hamrick, 2004; Jump & Peñuelas 2006).

Estudos de fragmentação florestal têm providenciado pouco suporte empírico para corroborar as predições dos efeitos negativos da fragmentação florestal (Foré et al., 1992; Young et al., 1993; Hall et al., 1994; Aldrich et al., 1998; White et al., 1999; Cascante et al., 2002; Petit et al., 2002; Bacles et al., 2004; Muir et al., 2004; Bacles et al., 2005; Lowe et al., 2005). Por outro lado, estudos de populações em remanescentes florestais que não demonstram um efeito negativo da fragmentação e redução de habitat não são, universais e, alguns trabalhos têm encontrado evidências de restrito fluxo de

pólen e aumento da endogamia em populações fragmentadas (Sork et al., 2002; Koenig & Ashely, 2003; Jump & Peñuelas, 2006).

Detectar os efeitos da fragmentação em plantas, nas florestas tropicais, é difícil. O tempo da fragmentação dos remanescentes florestais é recente em relação ao tempo de geração de muitas espécies arbóreas, dificultando avaliar os efeitos da deriva genética (Williams et al., 2007). Não menos importante, as investigações dos efeitos da fragmentação florestal são limitadas em função da ausência de réplicas (*i.e.*, fragmentos com área, forma, grau de isolamento e histórico de alteração semelhantes). No entanto, trabalhos que contemplam uma amostragem de remanescentes florestais em larga escala, como os realizados por Hall et al. (1994), Bacles et al. (2004), Muir et al. (2004) e Bacles et al. (2005) e, podem ser elucidativos se as informações da biologia das espécies e o histórico de fragmentação forem conhecidos.

No Brasil, o marco do processo de fragmentação ocorreu há 500 anos, com a derrubada de florestas para a ocupação da colônia européia e para a extração de madeiras como o pau-brasil (Dean, 1996). A exploração intensiva da madeira e mudanças no uso da terra pela agricultura e ocupação urbana, são os principais fatores responsáveis pela fragmentação de habitat (Salgueiro et al., 2004). Inserido neste panorama, o Estado de São Paulo, anteriormente ocupado por matas semidecíduas e cerrados, está praticamente tomado por culturas agrícolas e pastagens, restando apenas 13,9% da cobertura vegetal natural (Zorzetto et al., 2003). Diretrizes norteadoras do processo de repovoamento florestal heterogêneo no Estado têm sido promovidas visando à promoção da conservação de espécies vegetais, especialmente arbóreas de ocorrência regional (Barbosa, 2002), como algumas espécies do gênero *Ficus* (Moraceae).

Espécies do gênero *Ficus* foram escolhidas para o presente estudo devido ao seu papel chave nos ecossistemas tropicais (Shanahan et al. 2001), pela capacidade de dispersão de seus agentes polinizadores (Harrison 2003, Zavodna et al. 2005b) e dispersores (Shanahan et al. 2001) e pela ampla plasticidade ambiental favorecida por hábitos diversos em que ocorrem (*e.g.*, epífitas, hemiepífitas, terrestres).

Em vista do atual cenário florestal no Estado de São Paulo e, considerando que a diminuição da diversidade genética em espécies que desempenham papel chave nas florestas tropicais pode afetar a resiliência de espécies associadas, o presente estudo teve por objetivos: (1) caracterizar a diversidade e a estrutura genética de populações naturais de *Ficus citrifolia* P. Miller e *Ficus eximia* Schott em remanescentes florestais e, (2) verificar se a diversidade e a estrutura genética dessas populações sofrem alterações com a redução e fragmentação de habitat.

A conservação de figueiras nos ecossistemas naturais, em processos de fragmentação, e a restauração de ecossistemas fragmentados são desafios complexos que requerem conhecimentos sobre dinâmica populacional, biologia reprodutiva e diversidade e estrutura genéticas de suas populações. Desta forma, o entendimento do funcionamento e da susceptibilidade das populações de *Ficus* à fragmentação de habitat é fundamental para o estabelecimento de estratégias de conservação destas e de outras espécies ecologicamente relacionadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

Este estudo abrangeu três áreas, todas no interior do Estado de São Paulo, diferenciadas principalmente pela intensidade de fragmentação: paisagem muito, medianamente e pouco fragmentada. Como paisagem muito fragmentada selecionou-se uma área no município de Ribeirão Preto. Como paisagem medianamente fragmentada selecionou-se a região do município de Gália e como paisagem pouco fragmentada selecionou-se a região do Pontal do Paranapanema (Figura 4).

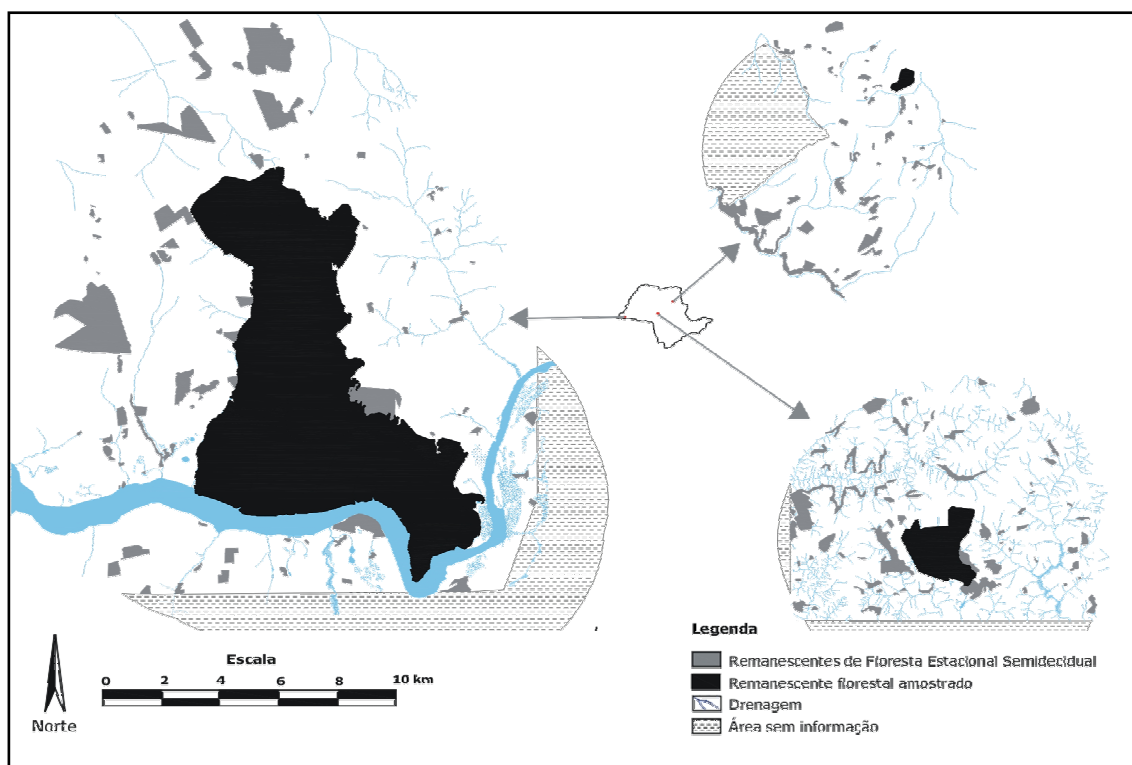


FIGURA 4 - Localização das áreas de estudo no Estado de São Paulo. (A) Região do Pontal do Paranapanema, (B) Região do município de Gália e (C) Região de Ribeirão Preto. Fonte: L.F.M. Coelho, dados não publicados.

Todas as áreas amostradas são remanescentes de floresta estacional semidecídua (Veloso et al., 1991). De maneira geral o processo de ocupação do interior paulista está relacionado à substituição da agricultura de subsistência e pecuária pela cafeicultura em ampla escala, processo que teve início por volta de 1870. Com a chegada de imigrantes que vieram substituir a mão-de-obra escrava e o avanço de ferrovias no interior do Estado, as cidades do interior paulista começaram a inchar e novas cidades começaram a ser fundadas, possibilitando um expressivo aumento na produção de café, às custas da substituição de áreas florestadas por fazendas (Walker & Barbosa, 2000). Um maior detalhamento do histórico de fragmentação para cada uma das três paisagens estudadas é apresentado.

2.1.1 Paisagem muito fragmentada

O município de Ribeirão Preto localiza-se nas coordenadas 21° 10' 30''S e 47° 48' 38''O com altitude variando entre 500 e 800 m. A ferrovia chegou a Ribeirão Preto em 1883, aumentando a capacidade de escoamento e conseqüentemente as áreas plantadas. Portanto, muitos dos remanescentes atuais provavelmente estão isolados a mais de 100 anos (Kotchetkoff-Henriques, 2005). Existem, aproximadamente, 887 ha de remanescentes de mata mesófila nesse município, distribuídos em 18 fragmentos que variam entre 1,5 e 180 ha (Kotchetkoff-Henriques, 2005). Nessa paisagem foi amostrado a Estação Ecológica de Ribeirão, uma área de aproximadamente 200 ha.

2.1.2 Paisagem medianamente fragmentada

A região do município de Gália localiza-se nas coordenadas 22° 24' 11''S e 49° 42' 05''O, com altitude variando entre 500 e 700 m. O grande diferencial do processo de substituição de áreas florestais por cafezais está associado ao Sr. Olavo Amaral Ferraz, que em 1927 comprou uma propriedade com cerca de 3.000 alqueires, reservando cerca de 900 alqueires de mata virgem como área de caça e ocupando a área restante com cafezais, portanto os fragmentos nessa região estão isolados a cerca de 80 anos. Com o passar dos anos, Ferraz adotou uma postura conservacionista, abandonando a caça. Receoso do destino da área de mata após a sua morte, Ferraz solicitou ao governo do estado a desapropriação da área florestada para criação de uma unidade de conservação, objetivo alcançado em 1976. Em 1987 a área foi transformada na Estação Ecológica de Caetetus (EEC), com 2176 ha de floresta estacional semidecidual (Tabanez et al., 2005). A paisagem ao redor da EEC, apesar de bastante fragmentada, possui fragmentos com área bastante expressiva, alguns atingindo entre 500 e 1000 ha, além de outros com menos de 100 ha (Tabanez et al., 2005). Nessa paisagem foi amostrado a Estação Ecológica de Caetetus.

2.1.3 Paisagem pouco fragmentada

A região do Pontal do Paranapanema (22° 26'S e 52° 20'O) teve a taxa de desmatamento aumentada acentuadamente em 1922, com a chegada da ferrovia em Presidente Prudente. De maneira que em 1941 o governo do Estado de São Paulo iniciou o processo de criação de três reservas florestais na região do Pontal do Paranapanema, totalizando 297.370 ha de floresta estacional semidecidual (Ditt, 2000). Entretanto, a

demora na efetivação das reservas, somada à influência dos fazendeiros na política estadual, fizeram com que, em 1946, o então Governador do Estado Ademar de Barros distribuisse as terras da reserva entre amigos e correligionários, causando uma drástica redução da cobertura vegetal nessa região (Dean, 1996). Das três reservas a única viabilizada foi a do Morro do Diabo, transformada em 1986 em Parque Estadual (Ditt, 2000). Atualmente, além dos 33.845 ha protegidos pelo Parque Estadual do Morro do Diabo (PE Morro do Diabo), restam 12.000 ha distribuídos em diversos remanescentes (Ditt, 2000). Nessa paisagem foi amostrado o Parque Estadual Morro do Diabo.

2.2 Amostragem

A amostragem dos indivíduos de *F. citrifolia* e *F. eximia* (Figuras 5, 6 e 7) foi assistemática, abrangendo indivíduos tanto agrupados como isolados, ao longo de cada área. O georeferenciamento espacial dos indivíduos de *F. citrifolia* e *F. eximia* nos fragmentos foi obtido utilizando o sistema de posicionamento global GPS (Garmin. Modelo GPS Map 60 CSx), com erro de aproximadamente 5 m. Medidas do diâmetro à altura do peito (DAP) e da altura foram obtidas para todos os indivíduos arbóreos. Por suas características – hemiepífita e com reprodução inicial, a determinação dos indivíduos reprodutivos de *F. citrifolia* não foi possível. Para *F. eximia*, a fim de captar os possíveis efeitos da fragmentação florestal, foram amostrados os indivíduos mais jovens com $DAP \leq 30$ cm. Extrapolando as estimativas de taxa de crescimento encontradas por Machado et al. (2007), os indivíduos de *F. eximia* com DAP de 30 cm teriam, aproximadamente, 68 anos – idade inferior ao tempo de isolamento dos remanescentes florestais que foram selecionados para este estudo.

As amostras de três a cinco folhas de cada indivíduo georeferenciado foram acondicionadas em sacos plásticos, refrigeradas em caixa térmica a 0° C e transportadas para o Laboratório de Genética Vegetal (FMRP - USP) onde foram armazenadas em freezer a -20° C, até o momento de extração do DNA.

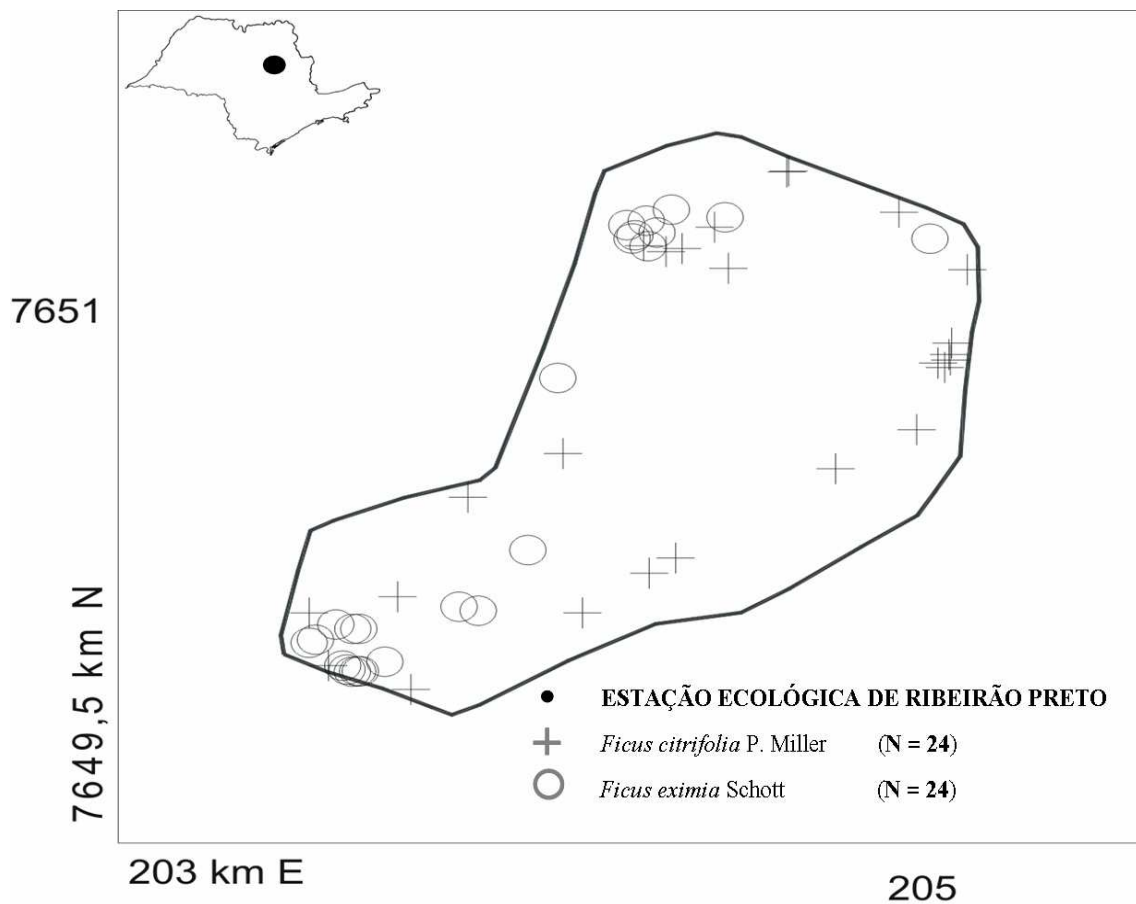


FIGURA 5 - Distribuição espacial dos indivíduos amostrados (N) de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* na Estação Ecológica de Ribeirão Preto. Coordenadas UTM (Datum Córrego Alegre).

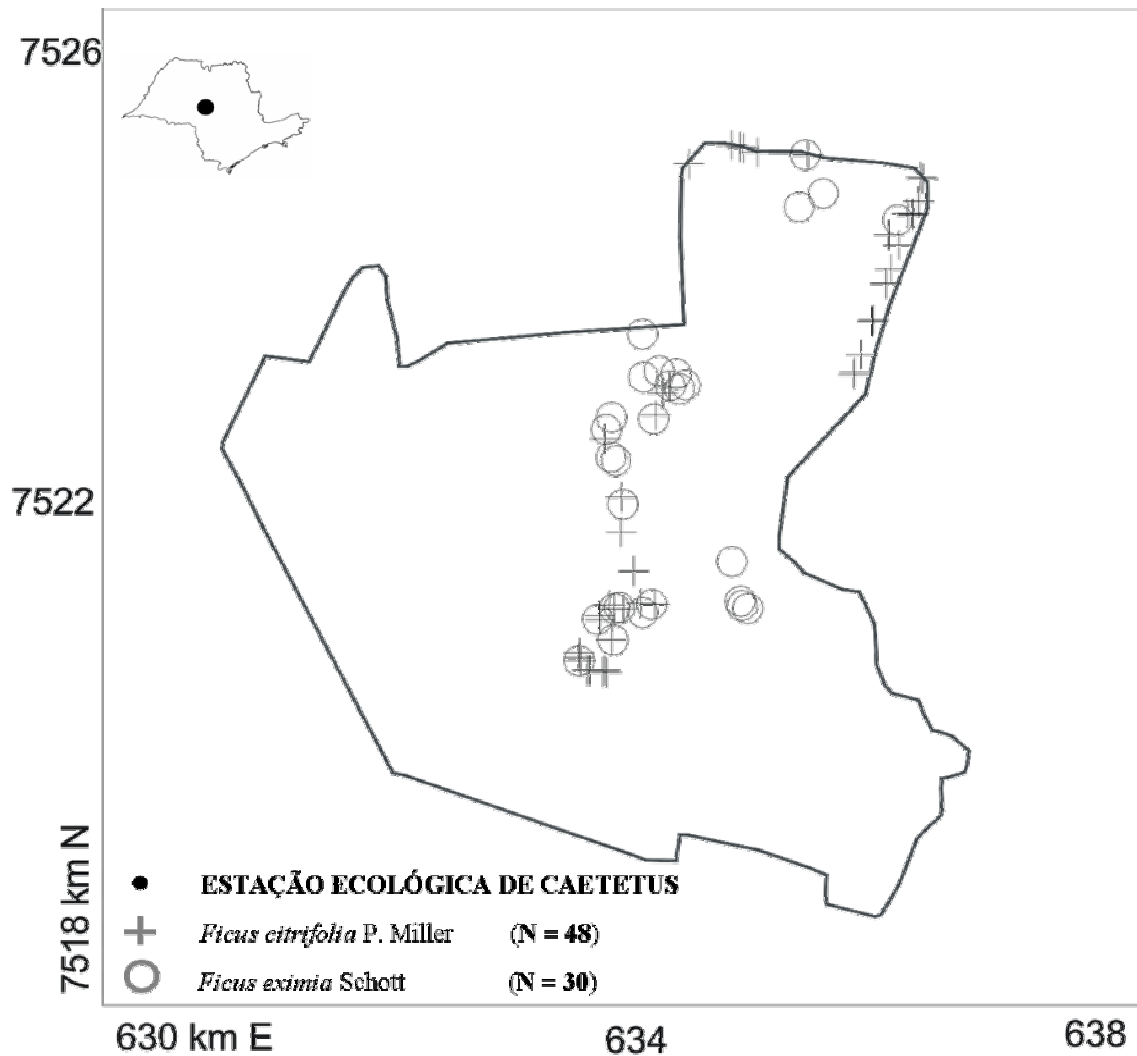


FIGURA 6 - Distribuição espacial dos indivíduos amostrados (N) de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* na Estação Ecológica de Caetetus. Coordenadas UTM (Datum Córrego Alegre).

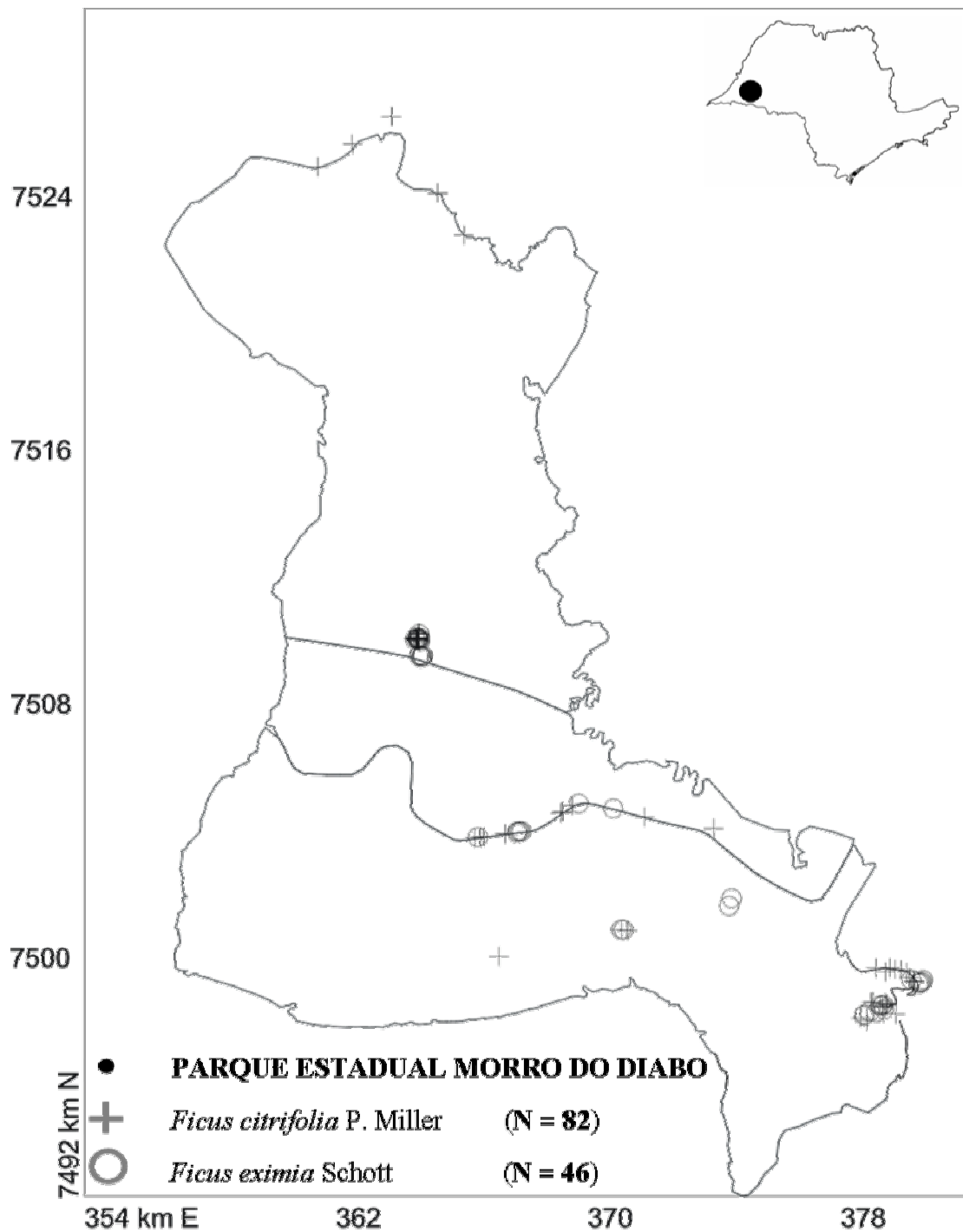


FIGURA 7 - Distribuição espacial dos indivíduos amostrados (N) de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* no Parque Estadual Morro do Diabo. Coordenadas UTM (Datum Córrego Alegre).

2.3 Extração e amplificação de DNA para análises genéticas

A extração de DNA das folhas foi realizada pela metodologia de Doyle & Doyle (1990), modificada por Alzate-Marin et al. (2005). As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador (*Eppendorf*[®]), utilizando 11 pares de marcadores SSR previamente transferidos e caracterizados para *F. citrifolia* e *F. eximia*. Para a amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR) foram utilizados 10 ng/μl de DNA genômico em um volume total de 10 μl contendo 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.9, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e d TTP), 0,20 μl de cada iniciador microsatélite 3' e 5' (F - *forward* e R - *reverse*; Tabela 4) e 0,12 unidades de *Taq* polimerase.

O protocolo de PCR consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguidos por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram separados sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida, 8M de uréia e 1 X TBE. Os fragmentos obtidos foram detectados em coloração com nitrato de prata (20%) segundo protocolo de Sanguineti et al. (1994). Terminada a etapa de coloração, os géis foram lavados, colocados sob placas de vidro e protegidos com papel celofane, para que pudessem ser deixados em superfície lisa para proceder a secagem ao ar livre. Após este procedimento, os géis foram fotodocumentados e armazenados.

TABELA 4. Marcadores SSR transferidos e caracterizados para *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia*.

<i>Locos SSR</i>	<i>Acesso GenBank</i>	<i>Produto esperado (pb)</i>
FinsT7	AM039810	193
FinsN1	AM039805	150
Frac86	DQ659281	153
Frac154	DQ659284	147
Frub29	DQ659290	188
Frub38	DQ659291	195
Frub61	DQ659292	145
Frub391	DQ659294	149
Frub415	DQ659297	150
Frub416	DQ659289	228
Frub422	DQ659298	172
Frub436	DQ659299	135

2.4 Análise dos dados

2.4.1 Análise do desequilíbrio de ligação

Para avaliar a independência de ligação, foi avaliada a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Weir, 1979), usando o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000). A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows é a mais indicada em situações em que a união de gametas pode ter ocorrido de forma aleatória não e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir, 1979). A hipótese de segregação independente foi testada com o teste qui-quadrado descrito por Weir (1979).

2.4.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Para testar a hipótese que as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizou-se o teste exato de Fisher pelo programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zakin, 2000).

2.4.3 Aderência ao Equilíbrio de mutação e deriva

Para verificar se as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* encontram-se em equilíbrio entre mutação e deriva genética, ou seja, $H_e = H_{eq}$, análises foram realizadas com todos os locos polimórficos de *F. citrifolia* e *F. eximia*. Desvios significativos do equilíbrio de mutação e deriva (efeito gargalo, por exemplo) são importantes de serem detectados e têm sido analisados no estudo de genética de populações (Bacles et al., 2004; van Rossum & Prentice, 2004; Ramakrishnan et al., 2005). A hipótese nula foi testada pelo teste do sinal de Wilcoxon, por ser o mais robusto quando utilizado para menos de 20 locos (Piry et al., 1999), baseando-se em 5.000 replicações. Para isso, utilizou-se o programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Estes testes baseiam-se no princípio de que populações que experimentaram uma redução recente de seu tamanho efetivo populacional (entre 12 gerações, segundo van Rossum & Prentice, 2004) exibem uma redução mais rápida do número de alelos do que da heterozigosidade esperada (H_e) pelas proporções de EHW nos locos polimórficos. Assim, segundo Luikart et al. (1998), populações que passaram por um processo recente de gargalo genético apresentam um excesso temporário de heterozigosidade. Isso faz com que H_e se torne maior que a heterozigosidade esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva (H_{eq}), pois esta é calculada a partir do número de alelos (Cornuet & Luikart, 1996; Piry

et al., 1999). Conseqüentemente, em uma população que sofreu um recente processo de gargalo genético, espera-se que $H_e > H_{eq}$.

2.4.4 Diversidade genética intrapopulacional

A partir das frequências alélicas foram obtidos os seguintes índices de diversidade genética:

- a) porcentagem de locos polimórficos (P): foi obtida pela média aritmética do número de locos polimórficos pelo número total de locos. Os locos foram considerados polimórficos quando a frequência do alelo mais comum não excedeu 95%, conforme sugerido por Nei (1987), para amostras inferiores a 50 indivíduos;
- b) número médio de alelos por loco (\hat{A}): obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. Esta estimativa fornece uma idéia da distribuição dos alelos nas diferentes populações estudadas;
- c) heterozigosidade média observada (H_o): foi obtida pela razão entre o número total de heterozigotos e o número de indivíduos;
- d) heterozigosidade média esperada (H_e): foi obtida segundo as frequências genotípicas esperadas, conforme equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), pela média aritmética entre todos os locos polimórficos analisados (Nei, 1987).

O coeficiente F de Wright (1931), que mede a correlação dos alelos nos gametas que formam um zigoto, foi obtido por loco e pela média dos locos, a partir das seguintes relações: $f = 1 - H_o/H_e$ (loco) e $f = 1 - H_o/H_e$ (média entre locos), sendo f a estimativa do índice de fixação de Wright; H_o a estimativa da heterozigosidade observada e H_e a estimativa da heterozigosidade esperada. Esses índices foram obtidos utilizando-se o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000). Para as estimativas obtidas dos

índices de fixação médios considerando cada população, foram estabelecidos intervalos de confiança a 95% de probabilidade, utilizando-se o procedimento de *bootstrap* com 10.000 repetições (Weir, 1996). Além disso, utilizou-se o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) para verificar se existem diferenças nas estimativas de diversidade genética entre as espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* e entre suas populações.

2.4.5 Estrutura genética

A estrutura genética foi abordada a partir da estatística F de Wright obtida a partir da decomposição dos componentes de variação da análise de variância das frequências alélicas inter e intrapopulacionais. Foram estimados a distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), assim como dos níveis de endogamia ao nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}). Para verificar se estas estimativas médias eram diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança com 95% de probabilidade, pelo método de reamostragem *bootstrap*, utilizando-se 10.000 repetições sobre os locos. Essas análises foram efetuadas nos programas GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000) e FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). A presença de alelos nulos foi verificada usando o programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desequilíbrio de ligação

Os alelos identificados nos 11 locos das populações de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* no Parque Estadual Morro do Diabo, na Estação Ecológica de Caetetus e na Estação Ecológica de Ribeirão Preto não estão associados e segregam independentemente. Desta forma, todos os locos foram considerados nos estudos de diversidade e estrutura genética de *F. citrifolia* e *F. eximia*.

3.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weibeng

Os resultados do teste exato de Fischer para verificar se as proporções genotípicas se ajustam ao modelo de EHW para cada loco encontram-se na Tabela 5. O modelo de equilíbrio tem como pressupostos cruzamentos aleatórios, ausência de mutação, migração, seleção, deriva genética e tamanho infinito das populações (Futuyma, 1992). Em geral, as espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* apresentam locos aderidos ao EHW em todos os fragmentos. No entanto, para *F. citrifolia* e *F. eximia*, nas populações do PEMD e na EEC, a maioria dos locos apresentam desvios significativos ao EHW. Estes desvios podem ser decorrentes da subestruturação populacional principalmente nas áreas maiores e, pela presença de alelos nulos (Tabela 5). Além disso, os desvios do EHW, nas populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* no PEMD, na EEC e na EERP podem ter sido causados por uma restrição evolutiva imposta pelo mutualismo, dado a sua dependência reprodutiva de polinizadores específicos e pela presença de assincronismo de floração e frutificação, pela distribuição espacial dos indivíduos e pela capacidade de dispersão dos agentes polinizadores a longas distâncias.

TABELA 5. Presença de alelos nulos e probabilidades do teste exato de Fisher para a hipótese do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os indivíduos de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* nos fragmentos Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP).

Locos	P (Fisher)					
	<i>Ficus citrifolia</i>			<i>Ficus eximia</i>		
	PEMD	EEC	EERP	PEMD	EEC	EERP
Fins0T7	0,000•	0,001•	0,813	--	--	--
Fins0N1	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,001
Frac086	0,000•	0,000•	0,179	0,000•	0,000•	0,858
Frac154	--	--	--	0,000	0,006	0,167
Frub029	0,006•	0,151	0,015•	0,000•	0,065	0,116
Frub038	0,012•	0,117	0,388	0,000•	0,000•	0,234
Frub061	0,000•	0,000•	0,002•	0,001•	0,000•	0,105
Frub391	0,000•	0,000•	0,031	0,005	0,032	0,003
Frub415	0,439	0,642	0,039	0,912	0,183	0,779
Frub416	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,003
Frub422	0,000•	0,005•	0,444	0,032	0,546	0,664
Frub436	0,000•	0,000•	0,020•	0,001•	0,000•	0,162

Significativo $P < 0,05$; • presença de alelos nulos; -- loco monomórfico.

3.3 Aderência ao equilíbrio de mutação e deriva

Pelos testes de adequação ao modelo de mutação de infinitos alelos (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart & Cornuet, 1998; Piry et al., 1999), as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia*, nas áreas de estudo, mostram-se em equilíbrio de mutação e deriva (Tabelas 6 e 7), exceto a população de *F. eximia* na Estação Ecológica de Ribeirão Preto que apresentou desvios marginalmente significativos ($P = 0,06$; Tabela 7), indicando a ocorrência de gargalo genético nesta população. van Rossum & Prentice (2004) e Vieira (2005) encontraram gargalos genéticos recentes em várias populações arbóreas, sendo interpretados como consequência da fragmentação das populações resultante de perturbação de humana.

TABELA 6. Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Ficus citrifolia* nas populações do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), da Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e da Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP).

POPULAÇÕES	N*	Déficit ¹	Excesso ²	Teste Wilcoxon	P
PEMD	6,48	2	9	0,087	0,104
EEC	5,98	3	8	0,141	0,163
EERP	5,31	3	8	0,097	0,146

* número esperado de locos com excesso de heterozigosidade sob o modelo, seguido por: ¹ locos com déficit de heterozigosidade e ² locos com excesso de heterozigosidade.

TABELA 7. Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Ficus eximia* nas populações do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), da Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e da Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP).

POPULAÇÕES	N*	Déficit ¹	Excesso ²	Teste Wilcoxon	P
PEMD	5,73	3	8	0,182	0,238
EEC	5,80	2	9	0,073	0,082
EERP	5,61	2	9	0,003	0,061

* número esperado de locos com excesso de heterozigosidade sob o modelo, seguido por: ¹ locos com déficit de heterozigosidade e ² locos com excesso de heterozigosidade.

O tempo de isolamento das populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* no Parque Estadual Morro do Diabo e na Estação Ecológica de Caetetus é recente (menos de 80 anos). Segundo Luikart et al. (1998), populações que passaram por um processo recente de gargalo genético devido à redução e fragmentação florestal apresentam um excesso temporário de heterozigosidade ($H_e > H_{eq}$). Isto foi observado para *F. eximia* na EERP, uma área fragmentada e isolada há pelo menos 120 anos.

3.4 Diversidade genética intrapopulacional

3.4.1 Frequências alélicas

As estimativas das frequências alélicas das populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* nos fragmentos florestais são apresentadas nas Tabelas 8 e 9. Para *F. citrifolia* e *F. eximia* foram detectados totais de 92 e 79 alelos, respectivamente. Pela análise das frequências alélicas dos 11 locos polimórficos nos três fragmentos estudados - Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP) - verifica-se a ocorrência de alelos exclusivos e raros (*i.e.*, alelos com frequência menor e ou igual a 5%; White et al. 1999) para *F. citrifolia* e *F. eximia*. No entanto, um menor número de alelos de baixa frequência (*i.e.*, raros) foi observado no fragmento de menor tamanho (Figura 8) indicando que as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* presentes nesta área (EERP) estão mais sensíveis às alterações pós-fragmentação, sendo susceptíveis a gargalos genéticos, como detectado para *F. eximia* na EERP. Gargalos genéticos experimentados por populações em decorrência das alterações de habitat podem causar a perda independente de alelos (predominantemente os raros) em cada fragmento, aumentando, portanto, a divergência genética interpopulacional (Jump & Peñuelas, 2006). White et al. (2002) investigando a distribuição da diversidade genética dentro de populações fragmentadas de *Swietenia humilis* em florestas tropicais detectaram perda de alelos de baixas frequências em locos microsatélites, corroborando a premissa do aumento da divergência genética em detrimento da perda de alelos raros.

TABELA 8. Frequências alélicas em locos microssatélites de *Ficus citrifolia* no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), na Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e na Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP).

Locos	Alelos	Populações			Locos	Alelos	Populações			
		PEMD	EEC	EERP			PEMD	EEC	EERP	
T7	172	0,02*	0,03*	0,04*	86	178	0,11	0,13	0,29	
	178	0,84	0,85	0,81		180	0,07	0,09	--	
	180	0,06	0,10	0,15		182	0,16	0,13	--	
	182	0,06	0,03*	--		184	--	0,09•	--	
	184	0,02*•	--	--		186	0,01*	0,05*	--	
N1	151	0,11	0,11	--	391	188	0,02*	0,02*	--	
	154	0,41	0,30	0,22		192	0,01*•	--	--	
	157	0,39	0,39	0,50		194	0,03*•	--	--	
	160	0,10	0,20	0,28		196	0,03*•	--	--	
29	186	0,10	0,13	0,15	136	0,01*•	--	--		
	192	0,45	0,24	0,33	138	0,05*	0,02*	0,05*		
	196	--	--	0,02*•	140	0,08	0,06	0,05*		
	196	--	--	0,02*•	142	0,20	0,20	0,18		
	198	0,09	0,20	0,19	144	0,18	0,17	0,34		
	204	0,12	0,12	0,10	146	0,20	0,32	0,23		
	210	0,08	0,07	0,06	148	0,14	0,13	0,11		
	216	0,04*	0,07	0,08	150	0,07	0,06	0,05*		
	222	0,12	0,16	0,06	152	0,02*	0,03*	--		
	228	--	0,03*•	--	154	0,01*	0,01*	--		
	38	190	0,03*	0,21	--	158	0,03*•	--	--	
		195	0,02*	--	0,02*	415	132	0,46	0,54	0,33
		200	0,03*	--	0,11		140	0,01*	0,04*	0,10
205		0,33	0,28	0,04	148		0,52	0,41	0,42	
210		0,29	0,27	0,43	416	156	0,01*	--	0,15	
215		0,12	0,08	0,04		212	0,07	0,02*	0,07	
220		0,18	0,16	0,24		216	0,27	0,19	0,34	
225	--	--	0,11•	220		0,21	0,31	0,16		
61	130	0,03*•	--	--	224	0,29	0,19	0,34		
	134	0,05*	0,07	--	228	0,15	0,29	0,09		
	138	0,02*•	--	--	232	0,02*•	--	--		
	142	0,06	0,03*	--	422	155	0,13	0,07	--	
	146	0,07	0,20	0,26		158	0,20	0,58	0,52	
	150	0,34	0,34	0,11		161	0,30	0,06	0,02	
	154	0,24	0,17	0,37		167	0,07	0,21	0,31	
	158	0,07	0,06	0,24		170	0,13	0,02*	--	
	162	0,03*	0,09	0,02*		173	0,08	0,03*	--	
	166	0,03*	0,03*	--		176	0,02*	0,03*	--	
	170	0,01*•	--	--	436	133	0,03*	0,04*	--	
	174	0,02*•	--	--		143	0,04*	0,05*	--	
	178	0,03*•	--	--		148	0,03*	0,04*	--	
86	166	0,08	--	0,02*		153	0,04*	0,05*	--	
	168	0,09	0,01*	0,02*	158	0,12	0,09	0,03*		
	170	0,01*	0,26	0,29	163	0,17	0,18	0,10		
	172	0,08	0,05*	0,10	168	0,31	0,27	0,55		
	174	0,12	0,07	0,19	173	0,17	0,12	0,18		
	176	0,10	0,10	0,08	178	0,09	0,15	0,15		

* alelos raros (frequência $\leq 0,05$); • alelos exclusivos; -- ausência do alelo no loco

TABELA 9. Frequências alélicas em locos microssatélites de *Ficus eximia* no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), na Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e na Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP).

Locos	Alelos	Populações			Locos	Alelos	Populações					
		PEMD	EEC	EERP			PEMD	EEC	EERP			
N1	158	0,03*	0,02*	--	86	174	0,14•	--	--			
	160	0,39	0,28	0,15		178	0,12	0,11	--			
29	162	0,50	0,50	0,46	154	144	--	0,07	0,10			
	164	0,08	0,20	0,40		147	0,23	0,24	0,13			
	195	0,05*	0,04*	--		150	0,27	0,24	0,35			
	200	--	--	--		153	0,23	0,26	0,13			
	205	0,06	0,11	0,17		156	0,27	0,17	0,29			
	210	0,20	0,11	0,15		159	--	0,02*•	--			
	215	0,23	0,15	0,02*		391	140	--	0,14•	--		
	220	0,17	0,20	0,23			144	0,15	0,31	0,08		
	225	0,06	0,13	0,23			148	0,35	0,22	0,08		
	230	0,09	0,11	0,08			152	0,32	0,19	0,21		
	235	0,06	--	0,13			156	0,18	0,14	0,35		
	240	0,06	0,11	--			160	--	--	0,21•		
	245	--	0,02*•	--			164	--	--	0,06•		
	255	--	0,02*•	--			415	158	0,34	0,37	0,19	
	38	197	0,18	0,13				--	164	0,66	0,63	0,81
202		0,02*•	--	--	416			215	0,08	0,07	0,19	
207		0,18	0,17	0,16				220	0,35	0,26	0,19	
212		0,11	0,23	--				225	0,42	0,59	0,27	
217		0,21	0,44	0,70				229	0,15	0,09	0,23	
222		0,29	0,04*	0,14				230	--	--	0,08•	
227		0,02*•	--	--				235	--	--	0,04*•	
61		120	0,06	0,02*		--		422	156	0,33	0,41	0,10
		125	0,04*	0,02*		--			158	0,30	0,27	0,29
		130	0,07	0,08		--			160	0,06	--	0,04*
		135	0,30	0,22		0,05*			162	0,03*	0,09	0,04*
		140	0,06	0,12		0,18			164	0,09	0,02*	0,06
		145	0,11	0,18		0,16			166	0,14	0,11	0,06
		150	0,15	0,18		0,34			168	0,03*	0,09	0,23
		155	0,06	0,02*		--	170		0,02*	--	0,17	
	160	0,07	0,10	0,27		436	148		0,04*	0,04*	--	
	165	0,07	0,06	--	153		0,02*		0,02*	--		
	170	0,02*•	--	--	158		0,23		0,24	--		
	86	162	0,04*•	--	--		163		0,04	0,04*	0,22	
		164	0,10	0,07	0,14		168		0,16	0,30	0,54	
		166	0,02*	0,07	0,27		173		0,05*	0,02*	0,24	
		168	0,20	--	0,07		178		0,18	0,11	--	
170		0,22	0,54	0,36	183		0,11	0,07	--			
172		0,16	0,21	0,16	188		0,18	0,15	--			

* alelos raros (frequência $\leq 0,05$); • alelos exclusivos; -- ausência do alelo no loco

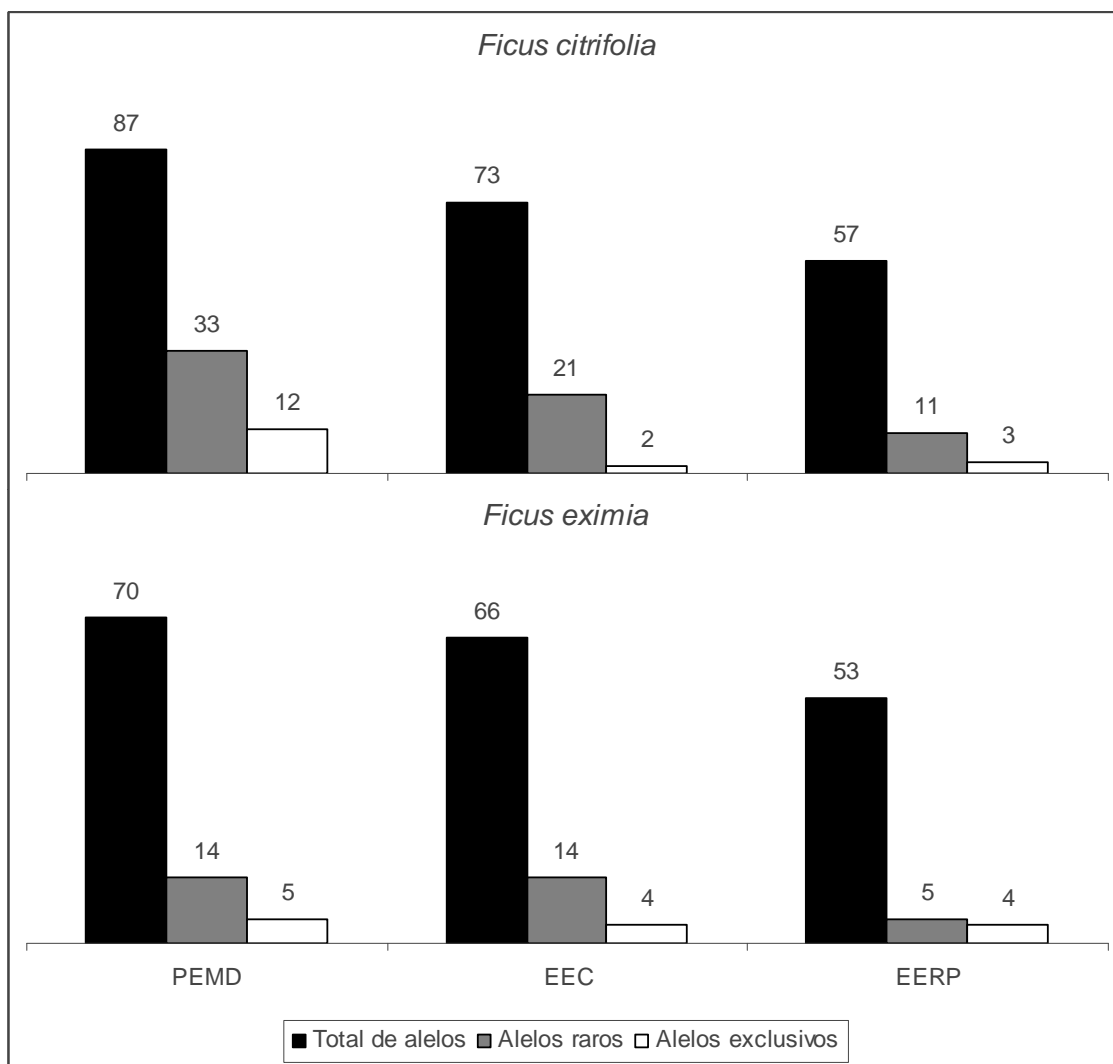


FIGURA 8. Número total de alelos, alelos raros e exclusivos para as populações de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD – 33.000 ha), na Estação Ecológica de Caetetus (EEC – 2.000 ha) e na Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP – 200 ha).

A riqueza alélica e a presença de alelos raros e exclusivos nas populações naturais são importantes para a tomada de decisões no âmbito da conservação dos recursos genéticos (Kalinowski, 2004). Portanto, tendo observado alelos exclusivos e raros nas populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* no PEMD, na EEC e na EERP, estratégias para a conservação genética *in situ* e *ex situ* são fundamentais para conservar e garantir a manutenção da variabilidade genética dessas populações.

3.4.2 Índices de variabilidade genética

Os índices de diversidade genética estimados a partir das frequências alélicas dos 11 locos microssatélites dos indivíduos de *F. citrifolia* e *F. eximia* amostrados nos fragmentos Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Ribeirão Preto são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. Índices de diversidade genética das populações de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), da Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e da Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP). \hat{A} : número médio de alelos por loco, H_o : heterozigosidade média observada, H_e : heterozigosidade média esperada e f : índice de fixação.

	<i>Ficus citrifolia</i>			<i>Ficus eximia</i>		
	PEMD	EEC	EERP	PEMD	EEC	EERP
\hat{A}	8,1 (3,6)	6,6 (2,6)	5,4 (1,7)	6,4 (2,9)	6,0 (2,6)	4,8 (1,9)
H_o	0,59 (0,23)	0,64 (0,24)	0,68 (0,22)	0,69 (0,25)	0,66 (0,29)	0,72 (0,23)
H_e	0,73 (0,18)	0,72 (0,18)	0,69 (0,14)	0,75 (0,13)	0,73 (0,12)	0,69 (0,17)
f	0,18	0,11	0,01	0,08	0,10	-0,05
IC** 95%						
Limite inferior	-0,003	-0,054	-0,158	-0,162	-0,126	-0,186
Limite superior	0,343	0,245	0,168	0,297	0,306	0,069

() = desvio padrão; [] = intervalo de confiança; * = significativo a 5% de probabilidade; **: Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade, obtido do erro padrão da média do índice de fixação estimado a partir de 10.000 re-amostragem “bootstrapping” sobre locos.

Em *F. citrifolia* o número de alelos por loco variou de quatro a 15 (PEMD), de três a 11 (EEC) e de três a oito (EERP). Para *F. eximia*, a variação do número de alelos por

loco foi de dois a 10 (PEMD), de dois a 11 (EEC) e de dois a oito (EERP). As heterozigosidades média esperada (H_e) e observada (H_o) detectadas em todas as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* foram superiores a 58% e 68%, respectivamente (Tabela 10). O índice de fixação médio em todas as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* não diferiram estatisticamente de zero (Tabela 10), sugerindo que essas populações não são endogâmicas. Corroborando com os níveis elevados de diversidade genética observados para *F. citrifolia* e *F. eximia*, Nason et al. (1998) reportaram alta diversidade genética em outras espécies de *Ficus*. Nazareno & Carvalho (2009) investigando o sistema reprodutivo de *Ficus arpazusa* também identificaram expressivos índices de diversidade genética.

Os níveis elevados de diversidade genética detectados nas populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* pode ser reflexo da biologia reprodutiva dessas espécies, que apresentam forte protoginia, flores funcionalmente unissexuais e sincronia de florescimento em seus indivíduos e, pela capacidade de vôo a longas distâncias de suas vespas polinizadoras. Sork & Smouse (2006) sugerem que, em casos de espécies com polinizadores especializados e fluxo gênico mantido a longas distâncias, como ocorre nas espécies de *Ficus*, a fragmentação e o isolamento físico não impedem o fluxo gênico. Desta forma, o fluxo gênico mediado pelas vespas polinizadoras, entre fragmentos ou indivíduos isolados permite que novas recombinações genéticas ocorram, ampliando e mantendo a diversidade gênica das populações.

Desta forma, os resultados encontrados para *F. citrifolia* e *F. eximia* permitem inferir que, mesmo inseridas em paisagens fragmentadas, os indivíduos das espécies apresentaram elevados índices de diversidade genética. Estes resultados atestam o potencial de conservação genética *in situ* e *ex situ* dessas espécies. Ressalta-se que, nada pode mitigar totalmente os efeitos negativos da perda e fragmentação de habitats. A

perda da diversidade biológica e conseqüente diminuição progressiva da variabilidade genética é um processo irreversível. Hardin (1968) relatou que atrás dos mais variados problemas ambientais, como a perda de biodiversidade, está a mesma lógica da “tragédia dos comuns” – os benefícios são individualizados e os prejuízos coletivizados. Seguindo esta lógica, se pensarmos em desflorestamento: os lucros individuais para os que destroem as florestas são óbvios, mas a erosão do solo, a degradação de nascentes e do ar, as perdas na fauna, flora e funcionalidade dos ecossistemas (a exemplos da polinização e dispersão) são prejuízos compartilhados por todos nós. Assim, enquanto essa lógica persistir, a luta pela conservação da biodiversidade se torna prioritária.

3.4.3 Perda de diversidade genética

Embora uma redução significativa na diversidade genética de *F. citrifolia* e *F. eximia*, nos fragmentos florestais estudados, foi detectada usando como medida a riqueza alélica, a heterozigosidade média esperada (H_e , ou diversidade gênica) não apresentou diferenças significativas (Tabela 11). A riqueza alélica é mais sensível a redução no tamanho populacional do que a heterozigosidade devido à eliminação preferencial de alelos raros que contribuem pouco para esta estimativa (Nei et al., 1975; Cournuet & Luikart, 1996). Depois de uma redução do tamanho populacional, a diversidade gênica pode levar muitas gerações para chegar a um equilíbrio. A riqueza alélica, nesse sentido, pode refletir com maior precisão os atuais níveis de diversidade genética dos remanescentes florestais (Varvio et al., 1986; Cournuet & Luikart, 1996).

A teoria prediz uma grande perda de diversidade genética por deriva e endogamia em árvores sujeitas à fragmentação florestal, ainda que seja escasso um suporte empírico para esta teoria (Kramer et al., 2007). A fragmentação de habitat pode levar a

modificações no sistema reprodutivo das plantas, levando ao aumento da endogamia, reduzindo a adaptabilidade e a viabilidade dos indivíduos e, aumentando o risco de extinção local das populações (Ellstrand & Elam, 1993; Young et al., 1993; Young et al., 1996; Petit et al., 2002; Hamrick, 2004; Lowe et al., 2005; Jump & Peñuelas, 2006).

TABELA 11. Valores de probabilidade (gerados por 5.000 permutações) dos testes de igualdade entre populações para os índices de diversidade genética. *A*: número médio de alelos por loco; *Ho*: heterozigosidade média observada e *He*: heterozigosidade média esperada para as populações de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), da Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e da Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP).

POPULAÇÕES	<i>Ficus citrifolia</i>			<i>Ficus eximia</i>		
	<i>A</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>A</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
PEMD – EEC – EERP	0,04	0,31	0,47	0,01	0,60	0,13
PEMD – EEC	0,46	0,47	0,77	0,59	0,69	0,51
PEMD – EERP	0,01	0,08	0,13	< 0,001	0,59	0,09
EEC – EERP	0,32	0,47	0,28	0,12	0,18	0,31

Como no presente estudo, poucos trabalhos relataram uma diminuição significativa na diversidade genética em ao menos uma das medidas de variação genética (e.g., riqueza alélica, *He*, *Ho*). Exemplos incluem *Eucalyptus albens*, uma espécie zoocórica da Austrália (Prober & Brown, 1994), *Pithecellobium elegans*, uma espécie neotropical polinizada por insetos (Hall et al., 1996), *Fagus sylvatica* (Jump & Peñuelas, 2006) e *Quercus robur* (Vakkari et al., 2006), espécies anemocóricas das florestas temperadas. Em contraste, as espécies tropicais *Carapa guianensis* (Hall et al., 1994), *Caryocar brasiliense* (Colevatti et al., 2001) e *Dinizia excelsa* (Dick, 2001) e, as espécies das florestas temperadas da América do Norte, *Acer saccharum* (Foré et al., 1992; Ballal et

al., 1994) e da Europa, *Fraxinus excelsior* (Bacles et al., 2005), não apresentaram redução na variação genética em áreas fragmentadas.

Ainda há poucos estudos que apoiem predições teóricas de que as populações de plantas nos remanescentes florestais deveriam apresentar menor diversidade genética e maiores taxas de endogamia e diferenciação genética do que as populações em florestas contínuas (Jump & Peñuelas, 2006). Em uma revisão contemplando 23 espécies neotropicais (Lowe et al., 2005), efeitos limitados da fragmentação florestal foram encontrados em apenas cinco espécies e, nenhuma dessas previsões foram conclusivas em sua totalidade. O único estudo que encontrou um impacto negativo da fragmentação florestal, com redução da diversidade genética, foi uma investigação de populações de *Terminalia amazonia* em florestas contínuas comparada a populações em fragmentos florestais isolados há mais de 1000 anos (Pither et al., 2003).

Uma das dificuldades em avaliar os efeitos da fragmentação sobre as populações arbóreas é que em muitos casos, a redução de habitat é recente para que se possa detectar os efeitos pós-fragmentação, especialmente em espécies longevas. Os resultados encontrados para *F. citrifolia* e *F. eximia* só foram significativos em uma escala geográfica ampla, (*i.e.*, em comparações de áreas com reduções de até 160 vezes, como o PEMD e a EERP), pela amostragem ter incluído indivíduos estabelecidos pós-fragmentação e, pelo uso de marcadores moleculares altamente informativos. Neste contexto, os resultados obtidos indicam que a fragmentação de habitat, mesmo recente (< 200 anos), afeta negativamente as espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* reduzindo sua riqueza alélica.

3.5 Estrutura genética

As estimativas médias obtidas mostraram ausência de endogamia dentro (valores de F_{IS} não diferem estatisticamente de zero, $P < 0,05$; Tabelas 12 e 13) e para o conjunto das populações de *F. citrifolia* ($F_{IT} = 0,096$; IC_{95%}, = -0,096 – 0,264) e *F. eximia* ($F_{IT} = 0,162$; IC_{95%}, = -0,009 – 0,301) e, baixa divergência genética (F_{ST}) interpopulacional. Valores teóricos de F_{ST} variam de zero (populações não diferenciadas) a um (populações completamente diferenciadas), embora este máximo teórico seja pouco provável de ser alcançado nas populações naturais (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Para *F. citrifolia*, 97% da variabilidade genética encontra-se dentro de suas populações e, apenas 3% ($F_{ST} = 0,031$; IC_{95%}, = 0,015 – 0,054) de diferenciação genética é interpopulacional. Para *F. eximia*, 95% da variabilidade genética é intrapopulacional com diferenciação genética entre populações de 5% ($F_{ST} = 0,050$; IC_{95%}, = 0,033 – 0,069). Estes valores de F_{ST} são baixos em relação ao máximo teórico, entretanto, estão de acordo com o observado em outras espécies arbóreas tropicais (Dayanandan et al., 1999; Moraes et al., 1999; Botrel & Carvalho, 2004; Melo Júnior et al., 2004; Pinto & Carvalho, 2004; Pinto et al., 2004; Viera, 2005; Moura, 2005). Com relação às espécies florestais, Hamrick et al. (1992) constataram que diversos fatores influenciam os níveis de diversidade genética nas espécies tropicais. Espécies arbóreas, comparadas as outras formas de vida, apresentam uma alta variação intraespecífica e geralmente exibem menos variação entre as populações, particularmente nas espécies muito dispersas, com sistemas de cruzamento ao acaso e sementes dispersas pelo vento ou por animais (Hamrick et al., 1993).

TABELA 12. Estimativas dos coeficientes médios de endogamia dentro das populações (F_{IS}), do conjunto das populações (F_{IT}) e da divergência genética entre populações (F_{ST}) de *Ficus citrifolia* do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Estação Ecológica Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP).

	PEMD			EEC			EERP		
	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
PEMD							0,15	0,19	0,05*
EERP				0,08	0,11	0,03*			
EEC	0,16	0,18	0,03*						
IC** 95%									
Limite inferior	-0,02	-0,01	0,01	-0,08	-0,05	0,01	-0,03	-0,01	0,02
Limite superior	0,31	0,33	0,05	0,21	0,23	0,05	0,29	0,32	0,07

Valores no corpo das tabelas são estimativas médias obtidas por re-amostragem “jackknife” sobre todos os locos. F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} são significativamente diferentes de zero para *: $P < 0,05$. **: Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade, obtido do erro padrão da média estimado a partir de 10.000 re-amostragem “bootstrap”.

TABELA 13. Estimativas dos coeficientes médios de endogamia dentro das populações (F_{IS}), do conjunto das populações (F_{IT}) e da divergência genética entre populações (F_{ST}) de *Ficus eximia* do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Estação Ecológica Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Ribeirão Preto (EERP).

	PEMD			EEC			EERP		
	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
PEMD							0,03	0,11	0,08*
EERP				0,02	0,08	0,06*			
EEC	0,09	0,10	0,01						
IC** 95%									
Limite inferior	-0,15	-0,13	-0,01	-0,15	-0,08	0,04	-0,17	-0,08	0,05
Limite superior	0,30	0,31	0,03	0,17	0,22	0,08	0,19	0,26	0,11

Valores no corpo das tabelas são estimativas médias obtidas por re-amostragem “jackknife” sobre todos os locos. F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} são significativamente diferentes de zero para *: $P < 0,05$. **: Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade, obtido do erro padrão da média estimado a partir de 10.000 re-amostragem “bootstrap”.

Estudos de variação intraespecífica usando técnicas moleculares em espécies florestais demonstraram a existência de uma pronunciada estrutura genética dentro de várias espécies (Dawson et al., 1995; Gillies et al., 1999; Cardoso et al., 2000). Em

contraste, estudos com marcadores moleculares de DNA revelaram pouca variação genética entre populações de espécies arbóreas tropicais (Schierenbeck et al., 1997; Gillies et al., 1999). Desta forma, a alta variabilidade genética intrapopulacional, além das características inerentes a cada espécie, pode ser também em função da alta taxa de mutação dos locos microssatélites (Kayser et al., 2000).

Nos casos em que se observam baixa diferenciação genética entre populações, como detectado para *F. citrifolia* (Tabela 12) e *F. eximia* (Tabela 13), o fluxo gênico pode estar contrapondo os efeitos da deriva genética. Esta abordagem foi utilizada por McCauley et al. (1995) ao verificar uma baixa diferenciação entre populações de *Silene alba* utilizando isoenzimas e *cpDNA* e, por Ciampi (1999) em estudos com *Copaifera langsdorffii*. Por outro lado, mesmo aparentemente isoladas geograficamente (≈ 350 km distantes entre si), as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* no PEMD, na EEC e na EERP estão inseridas em paisagens onde co-ocorrem fragmentos florestais (Figura 4). Evidências empíricas indicam que fragmentos florestais não definem populações, uma vez que o fluxo gênico via pólen (Dow & Ashley, 1998; Streiff et al., 1999; Apsit et al., 2001; White et al., 2002; Latouche-Halle et al., 2004; Nakanishi et al., 2004) e semente (Daily et al., 2001; Estrada & Coates-Estrada, 2002; Jones et al., 2005; Bacles et al., 2006; Gonzáles-Martinez, 2006b; Sato et al., 2006) ocorre além das áreas dos fragmentos. Em tal cenário, os fragmentos seriam completamente congruentes com fluxo gênico mitigando o efeito do isolamento ocasionado pela fragmentação florestal. Neste contexto, a baixa diferenciação genética e níveis similares de heterozigosidade esperada (H_e), como os observados para *F. citrifolia* e *F. eximia* em todos os fragmentos (Tabela 10), indicam que a dispersão histórica de pólen e semente foi extensiva no Estado de São Paulo, sugerindo que esta região poderia estar sobre panmixia. Ainda sobre esta perspectiva e, considerando a dispersão a longas distâncias

de pólen (Nason et al., 1998; Zavodna et al., 2005b; Nazareno & Carvalho, 2009) e diásporos (Shanahan et al., 2001) em *Ficus* spp., as populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* podem ser panmíticas, mesmo inseridas em paisagens fragmentadas. Aliado a isto, acredita-se que a baixa diferenciação genética observada para as espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* é devido ao tempo de pós-fragmentação não ter sido suficiente para retratar divergências genéticas nessas populações. No entanto, ressalta-se que a divergência genética entre as populações de *F. exima* do PEMD e EERP foi alta e significativa ($F_{ST} = 0,080$; IC_{95%} = 0,050 – 0,111). Uma vez que as estimativas de diferenciação genética são baseadas nas frequências alélicas, o valor de F_{ST} observado é corroborado pela diminuição da riqueza alélica, pela redução de alelos raros e pelo indicativo de efeito gargalo na população de *F. eximia* na EERP.

Ressalta-se que a baixa diferenciação e a ausência de endogamia, observadas nas populações de *F. citrifolia* e *F. eximia* nas áreas estudadas, sugerem que qualquer um dos remanescentes florestais podem providenciar diásporos para esforços de restauração e, ou enriquecimento de áreas degradadas, bem como para a conservação *ex-situ* dessas espécies.

3.6 Variação genética entre *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia*

As espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* apresentaram níveis semelhantes de diversidade genética (Tabela 14). Isto é, provavelmente, decorrente do fato dessas espécies compartilharem o mesmo sistema reprodutivo e os mesmos mecanismos de polinização e dispersão de diásporos. Os níveis de diversidade genética observados nessas espécies podem ser função da assincronia de florescimento que impede a auto-fertilização, dos

cruzamentos aleatórios mediados pelas vespas polinizadoras evitando a endogamia e, da interação estreita das vespas polinizadoras com suas plantas hospedeiras.

TABELA 14. Valores de probabilidades (gerados por 5.000 permutações) dos testes de igualdade entre *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* para os índices de diversidade genética. A: número médio de alelos por loco; H_o : heterozigosidade média observada e H_e : heterozigosidade média esperada.

	<i>Ficus citrifolia</i>	<i>Ficus eximia</i>	<i>P</i>
A	7,481	6,427	0,175
H_o	0,663	0,666	0,671
H_e	0,769	0,731	0,168

No entanto, a riqueza alélica das espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* é afetada negativamente pela fragmentação florestal, sendo *F. eximia*, aparentemente, mais sensível à redução de habitat. Uma vez que essas espécies têm algumas características ecológicas em comum, a susceptibilidade à fragmentação florestal das espécies de *Ficus* pode estar relacionada ao tipo de habitat, ao estágio de sucessão e ao hábito que ocorrem.

As figueiras diferem entre si em relação ao hábito, podendo ser arbustivas, arbóreas ou hemiepífitas (Berg, 1989). Essas últimas iniciam a sua vida como epífitas no topo de grandes árvores, e então estendem suas raízes ao longo do tronco da árvore hospedeira até se fixar no chão.

Ficus eximia, uma espécie terrícola, longa e ocorrendo preferencialmente no interior de mata (L.F.M. Coelho & R.A.S. Pereira, dados não publicados), deveria, teoricamente, manter suas populações estáveis visto que a longevidade assegura a representação de vários grupos dentro de uma população. Se os diferentes genótipos ou alelos são favorecidos durante a fase de estabelecimento, os indivíduos que sobrevivem à maturidade genética irão manter um "registro" de eventos evolutivos. A sua

continuada sobrevivência retardaria a perda da variação genética. Entretanto, com a fragmentação e a redução de áreas, os habitats tornam-se expostos a condições externas adversas, anteriormente inexistentes, o que resulta, em última análise, numa deterioração da diversidade biológica comprometendo a sobrevivência das espécies (Tilman et al., 1994). É neste contexto que *F. eximia* se insere: restrita, principalmente, ao interior de mata, modificações no habitat podem levar a perda de indivíduos reprodutivos e a uma diminuição no recrutamento de novos indivíduos, acarretando gargalos genéticos como o detectado na população da EERP.

Por outro lado, *F. citrifolia* por ser uma espécie, preferencialmente, hemiepífita, pioneira e com ciclo de vida mais curto (L.F.M. Coelho & R.A.S. Pereira, dados não publicados) estaria menos susceptível à redução e à fragmentação de habitat. O hábito hemiepífito contorna o problema de escassez de água no dossel, permitindo que as plantas desenvolvam e ampliem suas copas e desenvolvam suas raízes (Prósperi et al., 2001). Destarte, o hábito hemiepífito garante a *F. citrifolia* um maior sucesso de estabelecimento de suas plântulas, mesmo em áreas altamente fragmentadas, como foi observado nas áreas de estudo.

Contudo, a conservação de *F. eximia* requer, além da manutenção e criação de áreas protegidas, medidas que favoreçam o seu estabelecimento e incremento em áreas altamente fragmentadas como a EERP. O enriquecimento com mudas oriundas de populações fonte, com elevada riqueza alélica como encontrada no PEMD, em áreas propícias para o seu estabelecimento seria mister para subsidiar a adaptação local da espécie. Por ser, aparentemente, adaptada a áreas antropizadas, como é observado até mesmo em centros urbanos, a conservação de *F. citrifolia* é também necessária, haja vista a interdependência dessa espécie com outros organismos (e.g., vespas polinizadoras e dispersores).

Estudos futuros, que avaliem a fecundidade e o recrutamento de indivíduos de *F. eximia* e *F. citrifolia*, serão fundamentais para um melhor entendimento da susceptibilidade dessas espécies às alterações ambientais.

4. CONCLUSÕES

Os estudos realizados com *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia*, nas áreas de estudo, possibilitaram chegar as seguintes conclusões:

- A fragmentação florestal provavelmente reduziu a riqueza alélica das populações de *F. citrifolia* e *F. eximia*;
- A riqueza alélica e a presença de alelos raros e exclusivos nas populações naturais de *F. citrifolia* e *F. eximia* atestam o potencial de riqueza genética e a importância de se preservar os remanescentes florestais em que ocorrem;
- Mesmo inseridas em paisagens fragmentadas, os indivíduos das espécies de *F. citrifolia* e *F. eximia* apresentaram elevados índices de diversidade genética, caracterizando seu potencial para programas de conservação genética *in situ* e *ex situ*;
- A maior parte da variabilidade genética de *F. citrifolia* e *F. eximia* encontra-se dentro de suas populações;
- Em geral, não foi detectada a ocorrência de endogamia nas populações de *F. citrifolia* e *F. eximia*;
- As espécies *F. citrifolia* e *F. eximia* não apresentaram diferenças nas estimativas de diversidade genética.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da população humana e suas atividades econômicas têm resultado na destruição, degradação e fragmentação de florestas, constituindo uma séria ameaça à conservação da biodiversidade e, portanto, aos recursos genéticos. Entender e mitigar os impactos causados pelo rápido crescimento populacional e das atividades econômicas, que no Brasil têm provocado a redução anual de 1,7 milhões de hectares de florestas (Wright, 2005), são necessários. Para isto, a realização de pesquisas básicas e o entendimento da ecologia de paisagem, manejo de ecossistemas e o uso de ferramentas que auxiliem na tomada de decisões, como o uso de marcadores genéticos, é fundamental para a conservação de espécies. Além disso, a história natural e a biologia das espécies devem ser compreendidas, para que programas eficazes de conservação sejam adotados.

Unir conhecimentos ecológico e genético é essencial para compreender quão susceptíveis as espécies estão à fragmentação e à degradação de habitats naturais. Desta forma, os resultados encontrados para *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia* permitem inferir que, mesmo inserida em paisagens fragmentadas, os indivíduos da espécie apresentaram elevados índices de diversidade genética, ausência de endogamia, presença de alelos exclusivos e raros, e uma alta distribuição da variabilidade genética intrapopulacional. Tais resultados são reflexos do sistema reprodutivo da espécie (alogamia) e pela especificidade e capacidade de vôo de suas vespas polinizadoras, que dispersaram grãos de pólen a longas distâncias.

Para as regiões onde as florestas foram severamente reduzidas e degradadas, nas Filipinas, Madagascar, na floresta Atlântica e no Cerrado brasileiros (Laurance, 2005), a conservação de pequenas áreas é a única opção para se preservar os remanescentes

florestais. Assim, o princípio do SLOSS (*Single Large Or Several Small*) se fundamenta apenas na teoria, uma vez que, na prática, o que se tem para conservar são apenas vestígios florestais, com exceções das florestas do Congo e da Amazônia, que ainda possuem extensas áreas de floresta (Laurance, 2005).

Se apenas nos resta conservar os remanescentes florestais, estratégias que diminuam o risco de extinção local das populações, como a implantação de trampolins ecológicos, tornam-se viáveis, visto a sua importância para a manutenção do fluxo gênico e seu potencial para a resiliência de habitats degradados. Assim as figueiras, que têm papel chave nos ecossistemas, podem ser incrementadas em paisagens fragmentadas, funcionando como trampolins ecológicos. Isto favoreceria a disseminação de outras espécies arbóreas pela deposição de propágulos, além de permitir a continuidade de outras espécies correlacionadas (Nazareno & Carvalho, 2009).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. 1980. Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: clonal variation and frequency of progeny due to self fertilization. **Silvae Genetica**, 29: 1-4
- AHMED, S.; DAWSON, D.A.; COMPTON, S.G.; GILMARTIN, P.M. 2007. Characterization of microsatellite loci in the African fig *Ficus sycomorus* L. (Moraceae). **Molecular Ecology Notes**, 7: 1175-1177
- ALZATE-MARIN, A.L.; GUIDUGLI, M.; SORIANI, H.H.; MESTRINER, M.A. 2005. Otimização de um método econômico e rápido de extração de DNA para quatro espécies de árvores tropicais. In: Congresso Brasileiro de Genética, 51. Águas de Lindóia: **Anais...CD-ROM**. p. 510.
- ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGA, P.; KOCHERT, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, 7: 933-944
- APSIT, V. J.; HAMRICK, J. L.; NASON, J. D. 2001. Breeding population size of a fragmented population of a Costa Rican dry forest tree species. **Journal of Heredity**, 92: 415-420.
- BACLES, C. F. E.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. 2004. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. **Molecular Ecology**, 13: 573-584
- BACLES, C. F. E.; BURCZYK, J.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. 2005 Historical and Contemporary Mating Patterns in Remnant Populations of the Forest Tree *Fraxinus excelsior* L. **Evolution**, 59: 979-990
- BACLES, C. F. E.; LOWE, A. J.; ENNOS R. A. 2006. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. **Science**, 311: 628
- BALLAL, S. R.; FORÉ, S.A.; GUTTMAN, S.I. 1994. Apparent gene flow and genetic-structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. **Canadian Journal of Botany**, 72: 1311-1315
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, 11: 155-165
- BANDEJ, D.; JAVORNIK, B.; JAKSE, J. 2007. Development of microsatellite markers in the common fig, *Ficus carica* L. **Molecular Ecology Notes**, 7: 1311-1314
- BARBOSA, L.M. 2002. **Diretrizes da secretaria de estado do meio ambiente de São Paulo para reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas**. CINP-SMA – São Paulo. Disponível em : <<http://www.rc.unesp.br/xivsb/bsp/Mesa03MLMB.PDF>>
- BAWA, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, 28:85-92

- BAWA, K.S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forest. **Annual Review Ecology System**, 21:399-422
- BAWA, K. S. 1992. Mating systems, genetic differentiation and speciation in tropical rain forest plants. **Biotropica**, 24(2): 250-255
- BERG, C. C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. **Experientia**, 45: 605-611
- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, 27(3): 415-424
- BORÉM, A. 2007. **Biociologia Florestal**. Viçosa: UFV, 387 p.
- BRADSHAW, H. D.; STETTLER, R. F. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. **Theoretical Applied Genetics**, 89: 551-558
- BRONDANI, R. P. V.; GAIOTTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; KIRST, M.; GRIBEL, R.; GRATAPAGLIA, D. 2003. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, 3(2): 177-179
- BOTREL, M. C. G.; CARVALHO, D. 2004. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, 27(4): 621-627
- BRONSTEIN, J.L. 1992. **Seed predators as mutualists: ecology and evolution of the fig/pollinator interaction**. In *Insect-Plant Interactions*, ed. EA Bernays, pp. 1-47. Boca Raton, FL: CRC.
- BROWN, G. R.; GILL, G. P.; KUNTZ, R. J.; LANGLEY, C. H.; NEALE, D. B. 2004. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. **Proceedings National Academy Science USA**, 101: 15255-15260
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S. 2003. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica**, 20: 1-11
- BYRNE, M.; MURREL, J. C.; ALLEN, B.; MORAN, G. F. 1995. An integrated genetic linkage map for Eucalyptus using RFLP, RAPD and isozyme markers. **Theoretical Applied Genetics**, 91: 869-875
- CARAUTA, J.P.P. & DIAZ, B.E. 2002. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro, UFRJ. 212p.
- CARDOSO, N.B.; ELOY, J.; PROVAN, M.A.; FERREIRA, P.C.G. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**, 9: 1753-1760
- CARLSON, J. E.; TULSIERAM, L. K.; GLAUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical Applied Genetics**, 91: 194-200

CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J.J.; FUCHS, E.A. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology**, 16: 137-147

CHASE, M. R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K. 1996. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, 383(6599): 398-399

CIAMPI, A.Y. 1999. Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de Copaíba (*Copaifera Langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado. 204 f. **Tese** (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MARRAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical Application of Genetic**, 99: 65-72

COCKERHAM, C. C. 1969. Variance of gene frequencies. **Evolution**, 23(1): 72-84

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. 1999. Development and characterisation of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, 83: 748-756

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, 10: 349-356

COMPTON, S.G. 1990. A collapse of host specificity in some African fig wasps. **Society African Journal Science**, 86: 39-40

COOK, J.M.; RASPLUS, J.-Y. 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. **Trends in Ecology and Evolution**, 18(5): 241-248

COOK, J.M.; BEAN, D.; POWER, S.A.; DIXON, D.J. 2004. Evolution of a complex coevolved trait: active pollination in a genus of fig wasps. **Journal of Evolution and Biology**, 17:238-246

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, 144(4): 2001-2014

COUVET, D. 2002. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. **Conservation Biology**, 16(2): 369-376

CROZIER, Y.C.; JIA, X.C.; YAO, J.Y.; FIELD, A.R.; COOK, J.M.; CROZIER, R.H. 2007. Microsatellite primers for *Ficus racemosa* and *Ficus rubiginosa*. **Molecular Ecology Notes**, 7: 57-59

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, 8(10): 1585-1592

DAILY G. C.; EHRLICH, P. R.; S´ANCHEZ-AZOFEIFA, G. A. 2001. Countryside biogeography: utilization of human dominated habitats by the avifauna of southern Costa Rica. **Ecological Applications**, 11:1-13

DAWSON, I.K.; SIMONS, A.J.; WAUGH, R.; POWELL, W. 1995. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. **Heredity**, 74: 10-18

DEAN, W. 1996. **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira**. Companhia das Letras, São Paulo, 484 p.

DECROOCQ, V.; FAVE, M.G.; HAGEN, L.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S. 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. **Theoretical Application of Genetic**, 106: 912-922

DEVEY, M. E.; JERMSTAD, K. D.; TAUER, G. C.; NEALE, D. B. 1991. Inheritance of RFLP loci in a loblolly pine 3-generation pedigree. **Theoretical Applied Genetics**, 83: 238-242

DICK, C. W. 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. **Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences**, 268: 2391–2396.

DICK, C. W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, 12(3): 753-764

DICK, C.W.; HARDY, O.J.; JONES, F.A.; PETIT, R.J. 2008. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, 1: 20-33

DITT, E.H. 2000. **Diagnóstico da conservação e das áreas ameaçadas a fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema**, São Paulo. São Paulo, 97p. Dissertação de (Mestrado) PROCAM, Universidade de São Paulo.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. 1998. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **The Journal of Heredity**, 89: 62–70

DUTECH, C.; SORK, V. L.; IRWIN, A. J.; SMOUSE, P. E.; DAVIS, F. W. 2005. Gene flow and fine-scale genetic structure in a wind-pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). **American Journal of Botany**, 92(2): 252-261

EISEN, J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (eds) **Microsatellites – evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford, UK, p. 34-48.

ELLSTRAND, N.C.; ELLAN, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematic**, 24: 217-242

ENGEL, S.R.; LINN, R.A.; TAYLOR, J.F.; DAVIS, S.K. 1996. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammology**, 2: 504-518

EPPERSON, B. K.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R. 1997. Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. **Evolution**, 51: 275-282

ESTRADA, A.; COATES-ESTRADA, R. 2002. Bats in continuous forest, Forest fragments and in an agricultural mosaic habitat-island at Los Tuxtlas, Mexico. **Biological Conservation**, 103: 237–245

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.

FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P.R.; SANTOS, M.O.; MAYOR, M.S.; MESTRINER, M.A.; SOUZA, A.P.; ALZATE-MARIN, A.L. 2007. Genetic analysis of Forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, doi: 10.1007/s10592-007-9458-0

FINKELDEY, R. 2005. **An Introduction to Tropical Forest Genetics**. Lecture Notes. Georg-August University Göttingen, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 241 p.

FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 12: 432-440

FORÉ, S. A.; HICKEY, R. J.; VANKAT, J. L.; GUTTMAN, S. J.; SCHAEFER, R. L. 1992. Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. **Canadian Journal of Botany**, 70(8): 1659-1668

FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; QUESADA, M. 2003. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, 17(1): 149-157

FUTUYMA, D. J. 1992. **Biologia evolutiva**. 2° ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 646p.

GAIOTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. 1997. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical Applied Genetics**, 95: 842-849

- GALIL, J.; EISIKOWITCH, D. 1968. On the pollination ecology of *Ficus Sycomorus* in East Africa. **Ecology**, 49(2): 259-269
- GIBERNAU, M.; BUSER, H.R.; FREY, J.E. & HOSSAERT-McKEY, M. 1997. Volatile compounds from extracts of figs of *Ficus carica*. **Phytochemistry**, 46: 241-244
- GILLIES, A.C.M.; NAVARRO, C.; LOWE, A.J.; NEWTON, A.C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J.; CORNELIUS, J.P. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**, 83: 722-732
- GIRALDO, E.; VIRUEL, M.A.; LÓPEZ-CORRALES, M.; HORMAZA, J.I. 2005. Characterization and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.). **Journal of Hort. Science and Biotechnology**, 80: 217-224
- GONELA, A. **Análise da estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais e respectivas progênies de *Copaifera langsdorffii* Desf. utilizando marcadores microssatélites**. 2005. 83 f. Tese (Pós-Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- GONZALES, E.; HAMRICK, J. L. 2005. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum* **Heredity**, 95(4): 306-314
- GONZÁLEZ-ASTORGA, J.; NÚÑES-FARFÁN, J. 2001. Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongnartia vazquezii*. **Evolution Ecology Research**, 3(7): 961-872
- GONZALEZ-MARTINEZ, S. C.; ERSOZ, E.; BROWN, G. R.; WHEELER, N. C.; NEALE, D. B. 2006a. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. **Genetics**, 172: 1915-1926
- GONZALEZ-MARTINEZ, S. C.; BURCZYK, J.; NATHAN, R.; NANOS, N.; GIL, L.; ALIA, R. 2006b. Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). **Molecular Ecology**, 15: 4577–4588
- GOUDET, J. 2002. FSTAT version 2.9.3.2. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, 137: 1121-1137
- GROSS, C. L. 2005. A comparison of the sexual systems in the trees from the Australian tropics with other tropical biomes-more monoecy but why? **American Journal of Botany**, 92(6): 907-919

GUIDUGLI, M.C.; CAMPOS, T.; SOUSA, A.C.B.; FERES, J.M.; SEBBENN, A.M.; MESTRINER, M.A., CONTEL, E.P.B.C.; ALZATE-MARIN, A.L. 2008. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, doi 10.1007/s10592-008-9672-4

HALL, P.; ORRELL, L. C.; BAWA, K. S. 1994. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **American Journal of Botany**, 81(9): 1104-1111

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K. S. 1996. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, 10(3): 757-768

HAMRICK, J. L. 1982. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, 69(10): 1685-1693

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. *In* The evolutionary ecology of plants. *Edited by* J. L. Bock and Y. B. Linhart. Westview Press, Boulder, pp. 129-146.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; MURAWSKI, M.D.A.; LOVELESS, M.D. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, 6: 95-124

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A.; NASON, J. D. 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, 108(6): 281-297

HAMRICK, J.L. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, 197(1-3): 323-335

HARDIN, G. 1968. The tragedy of the commons. **Science**, 162:1243-1248

HARRISON, R.D. 2003 Fig wasp dispersal and the stability of a keystone plant resource in Borneo. **Proceedings of Royal Society of London Biology Science B**, 270: 76-79

HERRE, E.A. 1996. An overview of studies on a community of Panamanian figs. **Journal of Biogeography**, 23(4): 593-607

JONES, F. A.; CHEN, J.; WENG, G. J.; HUBBELL, S. P. 2005. A genetic evaluation of seed dispersal in the Neotropical tree *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). **The American Naturalist**, 166: 543-555

JOUSSELIN, E.; RASPLUS, J.-Y.; KJELLBERG, F. 2001. Shift to mutualism in parasitic lineages of the fig/fig wasp interaction. **Oikos**, 94: 287-294

JOUSSELIN, E.; HOSSAERT-McKEY, M.; HERRE, E.A. & KJELLBERG, F. 2003a. Why do fig wasps actively pollinate monoecious figs? **Oecologia**, 134: 381-387

JOUSSELIN, E.; RASPLUS, J.Y.; KJELLBERG, F. 2003b. Convergence and coevolution in a mutualism: evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. **Evolution**, 57(6): 1255-1269

JUMP, A.S.; PEÑUELAS, J. 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **PNAS**, 103(21): 8096-8100

KALINOWSKI, S.T. 2004. HP-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. **Molecular Ecology Notes**, 5(1): 187-189

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, 16: 1099–1106

KAYSER, M.; ROEWER, L.; HEDMAN, M.; HENKE, L.; HENKE, J.; BRAUER, S.; KRÜGER, C.; KRAWCZAK, M.; NAGY, M.; DOBOSZ, T. 2000. characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. **The American Journal of Human Genetics**, 66(5): 1580-1588

KHADARI, B.; HOCHU, I.; SANTONI, S.; KJELLBERG, F. 2001. Identification and characterization of microsatellite loci in the common fig (*Ficus carica* L.) and representative species of the genus *Ficus*. **Molecular Ecology Notes**, 1: 191-193

KIM, K.-S.; MIN, M.-S; AN, J.-H.; LEE, H. 2004. Cross-species amplification of Bovidae microsatellites and low diversity of the endangered Korean Goral. **Journal of Heredity**, 95: 521-525

KINNAIRD, M.F.; O'BRIEN, T.G.; SURYADI, S. 1996. Population fluctuation in Sulawesi Red-Knobbed Hornbills: tracking figs in space and time. **The Auk**, 113: 431-440.

KJELLBERG, F.; JOUSSELIN, E.; BRONSTEIN, J.L.; PATEL, A.; YOKOHAMA, J.; RASPLUS, J.-Y. 2001. Pollination mode in fig wasps: the predictive power of correlated traits. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, 268: 1113-1121

KOENIG, W.D.; ASHLEY, M.V. 2003. Is pollen limited? The answer is blowin' in the wind. **Trends in Ecology and Evolution**, 18: 157-159

KOTCHETKOFF-HENRIQUES, O.; JOLY, C. A.; BERNACCI, L. C. 2005. Soil and floristic composition of native vegetation remnants relationship in the municipality of Ribeirão Preto, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, 28(3): 541-562

KRAMER, A.T.; ISON, J.L.; ASHLEY, M.V.; HOWE, H.F. 2007. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, 22(4): 878-885

LATOUCHE-HALLE, C.; A. RAMBOER; E. BANDO; H. CARON; A. KREMER. 2004. Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, 13:1055–1064

LAURANCE, W.F. 2005. When bigger is better: the need for Amazonian megareserves. **Trends in Ecology and Evolution**, 20(12): 645-648

LAURANCE, W.F.; NASCIMENTO, H.E.M.; LAURANCE, S.G.; ANDRADE, A.; RIBEIRO, J.E.L.S.; GIRALDO, J.P.; LOVEJOY, T.E.; CONDIT, R.; CHAVE, J.; HARMS, K.E.; D'ANGELO, S. 2006. Rapid decay of tree-community composition in Amazonian forest fragments. **PNAS**, 103(50): 19010-19014

LEE, S. -L.; NG, K. K. -S.; SAW, L. -G.; NORWATI, A.; SALWANA, M. H. S.; LEE, C. -T.; NORWATI, M. 2002. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, 89(3): 447-459

LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, 93(4): 287-291

LEPSCH-CUNHA, N.; LUND, C. A.; HAMILTON, M. B. 2003. Isolation and characterization of nuclear microsatellite *loci* in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, 3(3): 435-437

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. 2000. Genetic data analysis: versão 1.1 for windows 95/nt. Available from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 15: 65-95

LOWE, A. J.; BOSCHER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, 95(4): 255-273

LUIKART, G.; ALLENDORF, F. W.; CORNUET, J. M.; SHERWIN, W. B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, 89(3): 238-247

LUIKART, G.; CORNUET, J. -M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, 12(1): 228- 237

MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. 2004. Floral Traits and Pollination Systems in the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. **Annals of Botany**, 94(3): 365-376

MACHADO, A.C.; GOMEZ, F.M.; SETTE-JR., C.R.; ALVARADO, J.R.; TOMAZELLO-F, M. 2007. Idade e taxa de crescimento de árvores de *Ficus eximia* Schott (Moraceae). In: 15° SIICUSP, ESALQ-USP, Piracicaba.

MARQUES, C. M.; ARAUJO, J. A.; FERREIRA, J. G.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D. M.; LIU, B. H.; SEDEROFF, R. R. 1998. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical Applied Genetics**, 97: 727-737

McCAULEY, D.; RAVEILL, J.; ANTONOVICS, J. 1995. Local founding events as determinants of genetic structure in a plant metapopulation. **Heredity**, 75: 630-636

MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S. R.; BEAZORTI, E. 2004. Estrutura genética de populações naturais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, 66: 56-65

MOLBO, D.; MACHADO, C.A.; STEVENSTER, J.G.; KELLER, L.; HERRE, E.A. 2003. Cryptic species of fig pollinating wasps: implications for sex allocation, precision of adaptation, and the evolution of the fig-fig wasp mutualism. **Proceedings of the Natural Academic of Science USA**, 100: 5867-5972

MOON, H.S.; NICHOLSON, J.S.; LEWIS, R.S. 2008. Use of transferable *Nicotiana tabacum* L. microsatellite markers for investigating genetic diversity in the genus *Nicotiana*. **Genome**, 51: 547-599

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOSKY, R. 1999. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, 22(2): 237-248

MOURA, M.C.O. Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande-MG. Lavras: UFLA, 2005, 165 p. **Tese** (doutorado) – Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MUIR, G.; LOWE, A.J.; FLEMING, C.C.; VOGL, C. 2004. High nuclear genetic diversity, high levels of outcrossing and low differentiation among remnant populations of *Quercus petraea* at the margin of its range in Ireland. **Annals of Botany**, 93: 691-697

MURCIA, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. p. 19-36 In: SCHELLAS, J.; GREENBERG, R. (Ed.). **Forest patches in tropical landscapes**

NAKANISHI, A.N.; TOMARU, H.; YOSHIMARU, T.; KAWAHARA, T.; YAMAMOTO, S. 2004. Patterns of pollen flow and genetic differentiation among pollen pools in *Quercus salicina* in a warm temperate oldgrowth evergreen broad-leaved forest. **Silvae Genetica**, 53:258-264.

NASON, J.D.; HERRE, E.A.; HAMRICK, J.L. 1996. Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig populations: evidence for substantial long-distance wasp dispersal. **Journal of Biogeography**, 23: 501-512

NASON, J.D.; HERRE, E.A.; HAMRICK, J.L. 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. **Nature** 391: 685-687

- NAZARENO, A.G.; CARVALHO, D. 2009. What the reasons for no inbreeding and high genetic diversity of the neotropical fig tree *Ficus arpausa*? **Conservation Genetics**, doi: 10.1007/s10592-008-9776-x
- NAZARENO, A.G.; SILVA, R.B.Q.; PEREIRA, R.A.S. 2007. Fauna de Hymenoptera em *Ficus* spp. (Moraceae) na Amazônia Central, Brazil. **Iheringia Série Zoologia**, 97:441-446
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, 29: 1-10
- NEI, M. F. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annal of Human Genetics**, 41: 225-233
- NEI, M.F. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 512 p.
- OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E. 2000. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of Central Brazil. **Flora**, 195(4): 311-329
- PEREIRA, R.A.S.; RODRIGUES, E.; MENEZES JR., A.O. 2006. Phenological patterns of *Ficus citrifolia* (Moraceae) in a seasonal humid-subtropical region in Southern Brazil. **Plant Ecology**, 188: 265-275
- PETIT, R.J.; LATOUCHE-HALLE, C.; PEMONGE, M.H.; KREMER, A. 2002. Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. **Forest Ecology and Management**, 156: 115-129
- PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. 2004. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, 27(3): 597-605
- PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. 2004. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia forestalis**, 65: 40-48
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, 90: 502-503
- PITHER, R.; SHORE, J.S.; KELLMAN, M. 2003. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. **Heredity**, 91: 307-313
- PONCET, V.; HAMON, P.; MINIER, J.; CARASCO, C.; HAMON, S.; NOIROT, M. 2004. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). **Genome**, 47: 1071-1081

- PROBER, S. M.; BROWN, A.H.D. 1994. Conservation of the grassy white box woodlands: population genetics and fragmentation of *Eucalyptus albens*. **Conservation Biology**, 8:1003–1013
- PRÓSPERI, J.; CABALLÉ, G. & CARAGLIO, Y. 2001. Lianas and hemiepiphytes: Distribution, development, and adaptations. **Selbyana**, 22(2): 197-212
- RAFALSKI, J.A.; MORGANTI, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M. e TINGEY, S.V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: BIERREN, B. et al. (Ed.). **Analysis of non-mammalian genomes: a practical guide**. New York: Academia Press, p. 75-134.
- RAMAKRISHNAN, U.; HADLY; E. A.; MOUNTAIN, J. L. 2005. Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. **Molecular Ecology**, 14(10): 2915-2922
- RAMIREZ, W.B. 1970. Host specificity of fig wasps (Agaonidae). **Evolution**, 24: 680-691
- REIS, M. S. 1996. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Revista Brasileira de Genética**, 19(4): 37-47
- ROA, A. C.; DUQUE E., M.C.; MAYA, M.M.; BONIERBALE, M.W.; IGLESIAS F. C.A.; TOHME M., J.; CHAVARRIAGA A., P. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, 87: 1647-1655
- SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; MARGIS-PINHEIRO, M. E MARGIS, R. 2004. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, 10: 201-210
- SANGUINETTI, C.J.; DIAS, E.N.; SIMPSON, A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechnology**, 17: 914-921.
- SATO, T.; ISAGI, Y.; SAKIO, H.; OSUMI, K.; GOTO, S. 2006. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity**, 96: 79–84
- SCHIERENBECK, K.A.; SKUPSKI, M.; LEIBERMAN, D.; LEIBERMAN, M. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species from Costa Rica. **Molecular Ecology**, 6: 137-144
- SHANAHAN, M.; COMPTON, S.G.; SO, S.; CORLETT, R. 2001. Figeating by vertebrate frugivores: a global review. *Biology Review*, 76: 529-572
- SORK, V.L.; DAVIS, F.W.; SMOUSE, P.E.; ASPIT, V.J.; DYER, R.J.; FERNANDEZ-M, J.F.; KUHN, B. 2002. Pollen movement in declining populations of California

Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone? **Molecular Ecology**, 11: 1657-1668

SORK, V. L.; SMOUSE, P. E. 2006. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. **Landscape Ecology**, 21:821-836

STEINKELLNER, H.; LEXER, C.; TURETSCHKE, E.; GLOESSL, J. 1997. Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. **Molecular Ecology**, 6: 1189-1194

STREIFF, R.; DUCOUSSO, A.; LEXER, C.; STEINKELLNER, H.; GLOESSL, J.; KREMER, A. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. **Molecular Ecology**, 8: 831

SUN, M. 1996. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. **Conservation Biology**, 10(3): 785-795

TABANEZ, M. F.; DURIGAN, G.; KEUROGHLIAN, A.; BARBOSA, A. F.; FREITAS, C. A.; SILVA, C. E. F.; SILVA, D. A.; EATON, D. P.; BRISOLLA, G.; FARIA, H. H.; MATTOS, I. F. A.; LOBO, M. T.; BARBOSA, M. R.; ROSSI, M.; SOUZA, M. G.; MACHADO, R. B.; PFEIFER, R. M.; RAMOS, V. S.; ANDRADE, W. J.; CONTIERI, W. A. 2005. Plano de manejo da Estação Ecológica de Caetetus. **IF Série Registros**, 29: 1-104

TILMAN, D.; MAY, R. M.; LEHMAN, C. L.; NOWAK, M. A. 1994. Habitat destruction and the extinction debt. **Nature**, 371:65- 66

VAKKARI, P.; BLOM, A.; RUSANEN, M.; RAISIO, J.; TOIVONEN, H. 2006. Genetic variability of fragmented stands of pedunculate oak (*Quercus robur*) in Finland. **Genetica**, 127: 231–241

VAN NOORT, S.; WARE, A.B. & COMPTON, S.G. 1989. Pollinator-specific volatile attractants released from the figs of *Ficus burttdavayi*. **Society African of Tydskr. Wet.**, 85: 323-324

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. 2004. Micro-checker, software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology**, 4: 535-538

VAN ROSSUM, F.; PRENTICE, H. C. 2004. Structure of allozyme variation in Nordic *Silene nutans* (Caryophyllaceae): population size, geographical position and immigration history. **Biological Journal of the Linnean Society**, 81(3): 357-371

VARVIO, S.-L.; CHAKRABORTY, R.; NEI, M. 1986. Genetic variation in subdivided populations and conservation genetics. **Heredity**, 57: 189-198

VELOSO, H.P; RANGEL-FILHO, A.L.; LIMA, J.C.A. 1991. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.

VERKERKE, W. 1989. Structure and function of the fig. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 45(7): 612-622

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. J. A. 1996. Biology and conservation of forest fragments in brazilian atlantic moist florest. In: SCHELLAS, J.; GREENBERG, R. (Ed.). **Forest patches in tropical landscapes**. Washington: Island Press, p. 151-167

VIEIRA, F.A. 2005. Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande-MG. Lavras: UFLA, 2005, 100 p. **Dissertação** (mestrado) – Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VIGNES, H.; HOSSAERT-McKEY, M.; BEAUNE, D.; FEVRE, D.; ANSTETT, M.-C.; BORGES, R.M.; KJELLBERG, F.; CHEVALLIER, M.H. 2006. Development and characterization of microsatellite markers for a monoecious *Ficus* species, *Ficus insipida*, and cross-species amplification among different sections of *Ficus*. **Molecular Ecology Notes**, 6: 792-795

WALKER, T. W.; BARBOSA, A. S. 2000. **Dos Coronéis à Metropole: fios e tramas da sociedade e da política em Ribeirão Preto no século XX**. Ed. Palavra Mágica. Ribeirão Preto – SP. 222p.

WARD, M.; DICK, C. W.; GRIBEL, R.; LEMES, M.; CARON, H. , LOWE, A. J. 2005. To self, or not to selfy... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, 95(4): 246-254

WARE, A.B.; COMPTON, S.G. 1994a. Responses of fig wasps to host plant volatiles cues. **Journal of Chemistry Ecology**, 20: 785-802

WARE, A.B.; COMPTON, S.G. 1994b. Dispersal of adult female fig wasps: 2. Movements between trees. **Entomological Experiment and Applied**, 73 (3):231-238.

WEIBLEN, G. D. 2002. How to be a fig wasp. **Annual Review of Entomology**, 47: 299-330

WEIBLEN, G.D. 2004. Correlated evolution in fig pollination. **Systematic Biology** 128: 128-139

WEIR, B.S. 1979. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, 35: 235-354

WEIR, B.S. 1996. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 455 p.

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, 8(11): 1899-1909

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis*

Zuccarini. **Proceedings of the National Academy Science of the United State of America**, 99(4): 2038-2042

WILLIAMS, C.G.; ELSIK, C.G.; BARNES, R.D. 2000. Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. Zimbabwe. **Heredity**, 84 (2): 261-268

WILLIAMS, D.A.; WANG, Y.; BORCHETTA, M.; GAINES, M.S. 2007. Genetic diversity and spatial structure of a keystone species in fragmented pine rockland habitat. **Biological Conservation**, 138: 256-268

WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, 16: 97-159

WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19(3): 395- 420

WRIGHT, S.J. 2005. Tropical forests in a changing environment. **Trends in Ecology and Evolution**, 20(10): 553-560

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversifying pear. **Theoretical and Applied Genetics**, 102(6-7): 865-870

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. 1996. Evaluation of the natural monement populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 37: 141-146

YOUNG, A. G.; MERRIAN, H. G.; WARWICK, S. I. 1993. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. **Heredity**, 71(4): 277-289

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends Ecology Evolutionary**, 11(10): 413-418

ZAVODNA, M., ARENS, P., VAN DIJK, P.J.; VOSMAN, B. 2005a. Development and characterization of microsatellite markers for two dioecious *Ficus* species. **Molecular Ecology Notes**, 5: 355-357

ZAVODNA, M.; ARENS, P.; DIJK, P.J.V.; PARTOMIHARDJO, T.; VOSMAN, B.; DAMME, J.M.M.V. 2005b. Pollinating fig wasps: genetic consequences of island recolonization. **Journal of Evolution Biology**, 18: 1234-1243

ZORZETTO, R.; FIORAVANTI, C.; FERRONI, M. 2003. A floresta renasce. **Pesquisa Fapesp**, 91: 48-52

ZUCCHI, M.I. 2002. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Piracicaba: ESALQ, 2002. 130p. **Tese** (Doutorado) – Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba, 2002

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)