

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADA: Patrícia de Abreu Moreira
ORIENTADOR: Dr. Geraldo Wilson Fernandes
CO-ORIENTADORA: Dr^a. Rosane Garcia Collevatti

BELO HORIZONTE

Agosto - 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Patrícia de Abreu Moreira

Efeitos da paisagem no fluxo gênico de *Tabebuia ochracea* (Cham.)
Standl. nas Matas Secas de Minas Gerais.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Biologia Geral da Universidade Estadual de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Geraldo Wilson Fernandes

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
2008

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Geraldo Wilson Fernandes, pela orientação e pelas oportunidades.

Ao professor Dr. Vasco Ariston Azevedo, por toda ajuda e apoio durante o mestrado.

À professora Dra. Rosane Garcia Collevatti, por me acolher no laboratório e em casa, pela orientação, pela amizade, pela confiança, por todo seu carinho.

A todos companheiros de coleta, em especial, Cássia, Fernanda (Gramps), Diego (Braúna), Jhon-Jhon e Fred.

Ao Zé Luiz (IEF) por todo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Tropi-Dry pelo financiamento das coletas, em especial ao professor Mário Marcos.

Às fundações Neves e Moreira pelo suporte financeiro na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Ribeiro, Dr. Jon Sullivann e Dr. Fernando Silveira por fornecerem materiais importantíssimos para este trabalho.

Ao pessoal da Universidade Católica de Brasília que me recebeu de braços abertos, em especial, à Alessandra Moreira.

À querida amiga Aline que me acolheu no laboratório e me hospedou em sua casa. Muito obrigada pela atenção, pelos ensinamentos e pela amizade. Meu muito obrigada também ao Rodrigo pela paciência e pela amizade.

Ao professor Dr. Renato Caparroz, por toda ajuda, pela companhia e pela amizade!

Ao Rennan Garcia que sempre esteve disposto a ajudar (e ajudou) no que fosse necessário, muito obrigada!

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida. Às minhas irmãs pela amizade e apoio e aos meus sobrinhos que encheram nossas vidas de alegria!

Ao Fred, que sempre acreditou neste trabalho e nunca me deixou desistir, por fazer toda coleta tornar possível e pelo empenho em me ajudar. Por todo amor, todo companheirismo e por acreditar em mim!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xii
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução.....	3
1.1. As Matas Secas.....	3
1.2. <i>Tabebuia ochracea</i> (Cham.) Standl. (Bignoniaceae).....	7
1.3. Microssatélites	10
1.4. Genética da Conservação	14
1.5. Efeitos da Paisagem e Fluxo Gênico.....	16
2. Objetivo	21
3. Material e Métodos	22
3.1. Caracterização da Área de Estudo.....	22
3.1.1. Parque Estadual da Mata Seca	22

3.1.2. Parque Estadual Lagoa do Cajueiro	23
3.2. Coleta do Material Vegetal	24
3.3. Extração de DNA genômico, transferibilidade, amplificação dos locos microsatélites e genotipagem	27
3.4. Caracterização dos Locos Microsatélites.....	28
3.4.1. Análise da Genotipagem – Evidências de alelo nulo, “stutter” e “dropout” de alelos.....	28
3.5. Barreira Geográfica	29
3.6. Alteração do Habitat	32
4. Resultados.....	35
4.1. Caracterização dos Locos Microsatélites.....	35
4.1.1. Análise da Genotipagem – Evidências de alelo nulo, “stutter” e “dropout” de alelos.....	37
4.2. Barreira Geográfica	38
4.3. Alteração do Habitat	42
5. Discussão	47
5.1. Caracterização dos Locos Microsatélites.....	47

5.1.1. Análise da Genotipagem – Evidências de alelo nulo, “stutter” e “dropout” de alelos.....	48
5.2. Barreira Geográfica	48
5.3. Alteração do Habitat	52
6. Conclusões.....	56
7. Referências Bibliográficas	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ambiente de mata seca na estação úmida (A) e na estação seca (B) do ano	3
Figura 2 – Localização das áreas de matas secas na América do Sul.....	5
Figura 3 – A) Indivíduo florido de <i>T. ochracea</i> ; B) Indivíduo pré-floração de <i>T. ochracea</i>	8
Figura 4 – Ambiente de mata seca na estação úmida (A) e na estação seca (B) do ano	9
Figura 5 – Folha, flor, fruto e sementes de <i>T. ochracea</i>	9
Figura 6 – Parques Estaduais do Estado de Minas Gerais, em destaque PEMS e PELC	24
Figura 7 – Locais de coleta: A) PEMS 1, B) PEMS 2, C) PEMS 3 e D) PELC	25
Figura 8 – Localização das populações coletadas em áreas de matas secas	26
Figura 9 – Relação genética entre indivíduos dentro das três populações de <i>T. ochracea</i>	41
Figura 10 – Coeficiente de parentesco médio (\pm EP) entre indivíduos de <i>T. ochracea</i> pertencentes às populações localizadas em margens distintas do rio São Francisco e populações localizadas na mesma margem.....	42

Figura 11 – Relação genética de indivíduos dentro e entre duas populações de *T. ochracea*.....45

Figura 12 – Coeficiente de parentesco médio (\pm EP) entre indivíduos de *T. ochracea* pertencentes a uma população conservada (PEMS 1) e a uma população alterada (PEMS 3).....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características das populações amostradas de <i>T. ochracea</i>	30
Tabela 2 – Características das populações amostradas de <i>T. ochracea</i>	32
Tabela 3 – Descrição dos locos microssatélites desenvolvidos para <i>Tabebuia aurea</i> e utilizados em <i>Tabebuia ochracea</i>	35
Tabela 4 – Caracterização dos locos microssatélites para 120 indivíduos adultos de <i>Tabebuia ochracea</i> de quatro populações.....	36
Tabela 5 – Desequilíbrio de ligação entre os pares de locos para <i>T. ochracea</i>	37
Tabela 6 – Características genéticas das três populações de <i>T. ochracea</i> baseadas em cinco locos microssatélites	38
Tabela 7 – Estrutura genética de três populações de <i>T. ochracea</i> baseada na análise de variância das frequências alélicas e no tamanho dos alelos para cinco locos microssatélites	39
Tabela 8 – Valores de θ par a par para três populações de <i>T. ochracea</i> baseada na análise de cinco locos microssatélites	39
Tabela 9 – Estimativas de fluxo gênico entre as populações de <i>T. ochracea</i>	40
Tabela 10 – Características genéticas das populações de <i>T. ochracea</i> baseadas em cinco locos microssatélites	43

Tabela 11 – Estrutura genética das populações de <i>T. ochracea</i> baseada na análise de variância das frequências alélicas e no tamanho dos alelos para cinco locos microssatélites.....	43
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μL	MicroLitro
μM	MicroMolar
BSA	Albumina de Soro Bovina
cm	Centímetro
CTAB	Cetil Trimetil-amônio brometo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EP	Erro Padrão
ha	Hectare
HCl	Ácido Clorídrico
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
Km	Quilômetro
Km ²	Quilômetro Quadrado
m	Metro
m ²	Metro Quadrado
mm	Milímetro
mg	Miligrama
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ML	Mililitro
mM	MiliMolar
ng	Nanograma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

Resumo

Os efeitos da paisagem sobre o fluxo gênico e estrutura genética de espécies nativas têm sido estudados para diversos táxons. Estudos com espécies arbóreas tropicais demonstram que as alterações do habitat, como consequência de ações antrópicas, podem inibir o fluxo gênico entre populações remanescentes, promovendo a diferenciação das populações. A presença de barreiras geográficas ao fluxo gênico, tais como montanhas e rios, também pode inibir o fluxo gênico entre populações separadas fisicamente, o que também promove a diferenciação das populações. Embora trabalhos desta natureza sejam importantes para conservação e manejo de espécies nativas, estudos com espécies nativas de matas secas são escassos ou mesmo ausentes. As matas secas correspondem a fitofisionomia mais ameaçada no Brasil e têm recebido pouca, ou nenhuma, atenção no contexto da conservação. Assim, este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da paisagem sobre o fluxo gênico de *Tabebuia ochracea* nas matas secas. Para isso foram testadas as hipóteses de que a alteração das matas secas promove a redução da diversidade genética em populações de *T. ochracea* estabelecidas após este evento e que o rio São Francisco atua como uma barreira geográfica ao fluxo gênico entre populações de *T. ochracea* de margens distintas. O trabalho foi conduzido no norte do estado de Minas Gerais em um remanescente de mata seca em que a espécie *T. ochracea*, conhecida popularmente como ipê-amarelo, ocorre em abundância. Para testarmos as hipóteses 301 indivíduos de quatro populações foram coletados e analisados com cinco locos microssatélites. Foi possível observar que as populações apresentam baixa diversidade genética, mas apesar disso não apresentam eventos de acasalamentos entre indivíduos aparentados. Os resultados mostram que o rio São Francisco não atua como barreira geográfica ao fluxo gênico entre populações de ipê-amarelo localizadas em diferentes margens e que a alteração do habitat nas matas secas não promoveu redução da diversidade genética em populações de ipê-amarelo estabelecidas após estas alterações. Estes resultados mostram que não há uma diferenciação genética entre as populações de *T. ochracea* estudadas devido à existência de fluxo gênico, que atua homogeneizando a variabilidade genética entre os indivíduos de diferentes populações. O fluxo gênico em *T. ochracea* é mantido pelo modo de dispersão do pólen e de suas sementes. As flores de *T. ochracea* são polinizadas por abelhas dos gêneros *Bombus* e *Centris*, que são abelhas de grande porte que podem forragear por longas distâncias, alcançando até 9,8 Km e 12 Km de vôo. Dessa forma, as abelhas polinizadoras de *T. ochracea* podem migrar entre as populações para forragear e, com isso, promover a troca de genes entre os indivíduos. Além disso, as sementes de *T. ochracea* são aladas, pequenas, leves, produzidas em grande quantidade e dispersas pelo vento, podendo atingir longas distâncias, até mesmo quilômetros. As sementes dispersas pelo vento podem ser ainda imunes a efeitos de descontinuidade do habitat. A paisagem de matas secas na qual os indivíduos de *T. ochracea* estão inseridos não afetam o fluxo gênico desta espécie, conseqüentemente, não promove a diferenciação das populações.

Abstract

The effects of landscape on gene flow and genetic structure of native species have been study for many taxa. Studies with tropical tree species exhibit that habitat modifications, as a result of human actions, can break gene flow among remnants populations, causing population differentiation. Geographic barriers to gene flow, as ridges and rivers, can also break gene flow among physically separated populations, which causes also population differentiation. Though this kind of researches are important to conservation and management of native species, works with tropical dry forest native tree species are scarce or absence. The seasonally dry tropical forest are more threatened phytophysiology in Brazil and have been received little or no attention in the context of conservation. The aim of this work was to verify the landscape effects on gene flow of *Tabebuia ochracea* in dry tropical forest. For this were tested the hypotheses that dry tropical forest modifications cause a genetic diversity reduction in *T. ochracea* populations formed after this event and that the Sao Francisco river is a geographic barrier to gene flow among *T. ochracea* populations on opposing banks. The study was realized in the north of Minas Gerais State in a dry forest remnant where *T. ochracea*, knowledge as ipê-amarelo, is abundant species. To test the hypotheses 301 individuals from four populations were collected e analyzed with five microsatellite loci. It was observed that the populations has low genetic diversity, nevertheless does not exhibit inbreeding. The results show that Sao Francisco river is not a geographic barrier to gene flow among ipê-amarelo populations on opposing banks and that dry tropical forest modifications does not causes a genetic diversity reduction in ipê-amarelo populations formed after this event. These results exhibit that there was not a genetic differentiation between *T. ochracea* populations because of gene flow, which act homogenizing the genetic variability among individuals of different populations. The gene flow in *T. ochracea* is kept for the dispersal of pollen and seeds. The flowers of *T. ochracea* are pollinated for bumblebees of the *Bombus* and *Centris* genus, that are large bees and foraging for long-distance, reaching 9,8 Km and 12 Km in a flight. Thus, the pollinator bumblebees of *T. ochracea* can migrate among populations to forage and thereby promote the exchange of genes between individuals. Besides, the seeds of *T. ochracea* are winged, small, produced in high quantity and dispersed by wind, reaching long distances, up to kilometers. The wind-dispersed seeds can be immune to the discontinued of habitat. The landscape of dry tropical forest where *T. ochracea* trees exist does not affect the gene flow of this species and does not promote the population differentiation.

1. Introdução

1.1 As Matas Secas

As florestas estacionais semidecíduais e decíduais (matas secas) são formações de florestas tropicais caracterizadas por diversos níveis de caducifolia durante a estação seca, dependendo das condições químicas, físicas e profundidade do solo (Ribeiro & Walter, 1998). A vegetação das matas secas apresenta pelo menos 50% de deciduidade durante a estação seca do ano (Figura 01), a temperatura anual média é $\geq 25^{\circ}\text{C}$ e a precipitação anual média varia entre 700 e 2000 mm, com pelo menos três ou mais meses secos por ano (precipitação ≤ 100 mm/mês) (Sánchez-Azofeifa et al., 2005). As matas secas ocorrem nos interflúvios, em solos geralmente mais ricos em nutrientes, como terra-roxa estruturada, cambissolos, brunizém, latossolo roxo e vermelho-escuro, onde predominam as florestas estacionais semidecíduais. Nos solos de origem calcária geralmente ocorrem as florestas estacionais decíduas, que podem apresentar composição florística diferenciada. No Brasil, a floresta estacional em solo calcário pode ter grande afinidade com a caatinga arbórea, devido a sua distribuição geográfica e características físicas e químicas do solo (Prado & Gibbs, 1993).



Figura 01- Ambiente de mata seca na estação úmida (A) e na estação seca (B) do ano.

Essa formação vegetal ocorre em manchas disjuntas em toda a região Neotropical, desde o México e Caribe até o sudeste do Brasil e os Chacos na

Argentina (Pennington et al., 2000), mas a maior parte dos remanescentes encontra-se hoje na América do Sul (Pennington et al., 2006). Embora floristicamente as matas secas apresentem diferenças na estrutura e composição, alguns padrões podem ser identificados, como a alta riqueza de espécies de famílias como Leguminosae e Bignoniaceae (Pennington et al., 2006). Miles e colaboradores (2006) estimam que aproximadamente 1.048.700 Km² de remanescentes florestais estejam espalhados pelo mundo, enquanto que a estimativa de existência das matas secas iniciais era de 3.000.000 Km² (Huber, 1987). Mais da metade dos remanescentes dessas florestas estão na América do Sul (54,2%), as demais áreas estão quase igualmente divididas entre as Américas do Norte e Central, África e Eurásia, com pequena proporção (3,08%) ocorrendo na Australásia e no sudeste da Ásia (Miles et al., 2006)

As matas secas estão entre as mais ameaçadas de todos os principais habitats de floresta tropical de terra baixa (Janzen, 1988). Segundo Werneck (2000) essas florestas foram reduzidas a pequenos fragmentos, geralmente perturbados, onde grandes áreas foram desmatadas para implantações de pastagens e agricultura.

Na América do Sul as matas secas estão distribuídas de forma altamente fragmentada, como em pequenas manchas isoladas nos vales da Cordilheira dos Andes, entre Colômbia e Bolívia (Mayle, 2006). As maiores áreas de matas secas na América do Sul, entretanto, são encontradas no nordeste brasileiro, centro-oeste e no estado de Minas Gerais, no sudeste (Figura 02) (Rizzini 1963, Ribeiro & Walter, 1998; Queiroz, 2006). Segundo Prado e Gibbs (1993) as matas secas atuais representam um remanescente de uma floresta mais contínua do período seco do Pleistoceno que formavam o Arco-pleistocênico. Posteriormente, com o aumento da temperatura e umidade, a partir do final do último período glacial, estas florestas podem ter retraído e atingido a distribuição atual. Caetano e colaboradores (2008) realizaram um estudo de filogeografia de *Astronium urundeuva* nas matas secas brasileiras e os resultados encontrados reforçam a hipótese de que essas matas exibiam uma formação mais contínua.

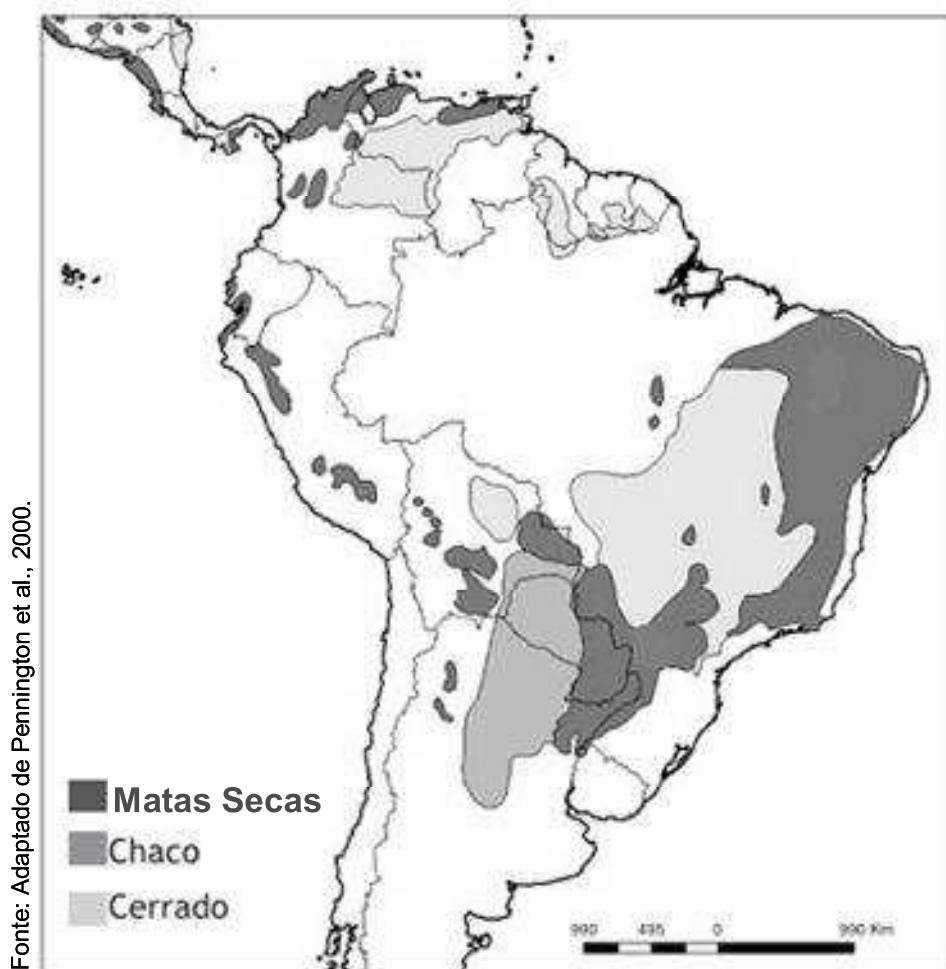


Figura 02- Localização das áreas de matas secas na América do Sul.

Existe uma lacuna de conhecimento em matas secas em relação a florestas tropicais úmidas. Apenas 14% dos estudos realizados em florestas tropicais foram realizadas em ambientes secos, enquanto 86% foram realizados em regiões úmidas (Sánchez-Azofeifa et al., 2005). Além disso, a informação científica em florestas tropicais secas é fragmentada e limitada a poucas áreas, como na América Central, onde ocupavam originalmente 50% dos ambientes florestais (Murphy & Lugo, 1986), principalmente em países como México e Costa Rica (Sánchez-Azofeifa et al., 2005).

As matas secas recebem menos investimentos não somente em termos de pesquisas científicas, mas também em termos de recursos para conservação em relação às florestas tropicais úmidas (Pennington et al., 2006). De acordo com Miles e colaboradores (2006) 97% das áreas remanescentes estão ameaçadas, principalmente, devido às mudanças climáticas, fragmentação do habitat, fogo,

conversão das áreas naturais em áreas agrícolas e aumento da densidade populacional humana. Para os conservacionistas, muitas são as razões para o descaso com as matas secas. Além da falta de recursos financeiros, Pennington e colaboradores (2006) destacam que muitos remanescentes de matas secas são pequenos e muito perturbados, o que pode causar a desvalorização dessas áreas em muitos países que possuem extensas áreas não-degradadas de uma outra floresta mais rica em espécies vegetais, como a floresta úmida. Segundo Murphy e Lugo (1986) outra dificuldade para conservação dessas áreas é o seu reconhecimento como um bioma único, com um nome consistente, como ocorre com a universalmente reconhecida “floresta úmida”. Outro problema para conservação das matas secas é a seleção de áreas prioritárias para reservas, já que as florestas secas têm sido reduzidas a pequenas áreas fragmentadas, formando mosaicos (Pennington et al., 2006). Pennington e colaboradores (2006) destacam ainda a importância da conservação de outros biomas vizinhos às matas secas ocorrentes em áreas de transição, para que seja permitido a migração de espécies entre estes ecótonos. A dificuldade em se conservar as matas secas no Brasil envolve o fato desses remanescentes florestais serem localizados em solos ricos nas áreas do centro-oeste e sudeste, geralmente solos oligotróficos e calcários (Espírito-Santo et al., 2006). Esses locais são utilizados para agricultura, como ocorre no estado de Minas Gerais (Anaya et al., 2006) e São Paulo, para exploração de calcário, como ocorre em Goiás, ou para implantação de pastagens, como ocorre em Minas Gerais (Anaya et al., 2006) e Goiás (Collevatti, comunicação pessoal). Além disso, nas matas secas existem árvores com madeira de alta qualidade, o que acelera a fragmentação e dificulta a conservação devido ao corte seletivo (Anaya et al., 2006). Dessa forma, os altos níveis de perturbação, sobretudo nos últimos dois séculos, decorrentes da retirada indiscriminada de madeira, da pecuária extensiva e do fogo, reduziram seriamente as formações de florestas estacionais decíduais a pequenos fragmentos (Werneck et al., 2000).

As matas secas em Minas Gerais estão situadas na região norte do estado. Estas formações podem ser encontradas tanto nos domínios do Cerrado como da Caatinga, sofrendo influência da fitofisionomia onde estão inseridas (Santos et al., 2007). Essa região está sofrendo intenso processo de fragmentação (Gomes, 2000) devido à presença de inúmeras espécies vegetais úteis, utilizadas para fins medicinais, alimentícios, entre outros (Oliveira et al., 2006). Pela proximidade do rio

São Francisco, as matas secas encontram-se sob forte pressão antrópica, com a implantação de plantios de milho e feijão e pela pecuária (Silva et al., 2004, Anaya et al., 2006).

Apesar da mata seca ser a fitofisionomia mais ameaçada do Brasil (Miles et al., 2006), praticamente nada se sabe a respeito da estrutura genética das suas espécies (mas veja Naciri et al., 2006). Uma vez que os efeitos da deriva gênica e depressão endogâmica são especialmente pronunciados em populações isoladas, o planejamento de reservas e do manejo sustentável de espécies exploradas economicamente deve levar em conta estes riscos. O monitoramento periódico e o entendimento destes processos genéticos nas populações, considerando as mudanças nas frequências alélicas, permitem uma preservação em longo prazo, visto que a perda de variabilidade e a depressão endogâmica podem ser detectadas e amenizadas com medidas mitigadoras, como o estabelecimento de corredores, a introdução de indivíduos de outras populações ou o controle do extrativismo.

Assim, a análise genética de espécies arbóreas de mata seca é de suma importância para avaliar a probabilidade de persistência das espécies nos remanescentes.

1.2 *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae)

A família Bignoniaceae está entre as dez famílias mais diversas de plantas lenhosas das florestas úmidas da região Neotropical. No entanto, a família é especialmente diversa em florestas estacionais semidecíduais e decíduais, sendo a segunda família mais diversa após Leguminosae (Gentry, 1986).

A espécie *Tabebuia ochracea* é conhecida popularmente como ipê-amarelo, pau d'arco ou ipê-cascudo. É uma espécie comum do bioma Cerrado e possui ocorrência abundante nas matas secas do Brasil (Oliveira-Filho, 2006) e de outros países como Costa Rica (Sullivan, 2000). É encontrada em várias regiões do Brasil, como Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. É possivelmente o mais comum dos ipês amarelos dos cerrados de Minas Gerais (Costa et al., 2004).

É uma espécie arbórea, com altura de até 20 m, tronco tortuoso, de 30 a 50 cm de diâmetro. Possui um florescimento exuberante que pode ocorrer entre os

meses de julho a outubro, quando a árvore apresenta-se totalmente despida da folhagem (Lorenzi, 1992) (Figura 03).



FIGURA 03- A) Indivíduo florido de *T. ochracea*; B) Indivíduo pré-floração de *T. ochracea*.

O amadurecimento dos frutos ocorre a partir da fase final do período de floração até final de novembro. Segundo Barros (2001) as flores de *T. ochracea* são polinizadas por abelhas das espécies *Centris violacea*, *C. albopilosa*, *C. discolor* e *Bombus morio* (Figura 04). Produz sementes aladas, com aproximadamente 72.000 unidades por quilograma, as quais são dispersas pelo vento. Anualmente são produzidas grandes quantidades de sementes viáveis (Lorenzi, 1992; Silva Junior, 2005). Suas folhas podem chegar a medir 10 cm de comprimento e de 3 a 6 cm de largura (Figura 05) e, segundo Ribeiro e colaboradores (1994), as folhas são predadas por insetos herbívoros sugadores, como por exemplo, *Rhabdotalebra longicornis*, *R. costalina*, *R. signata* (Homoptera: Cicadellidae) e *Tingis tecomae* (Hemiptera: Tingidae) e por insetos herbívoros mastigadores, como por exemplo, *Oedionychus* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae).

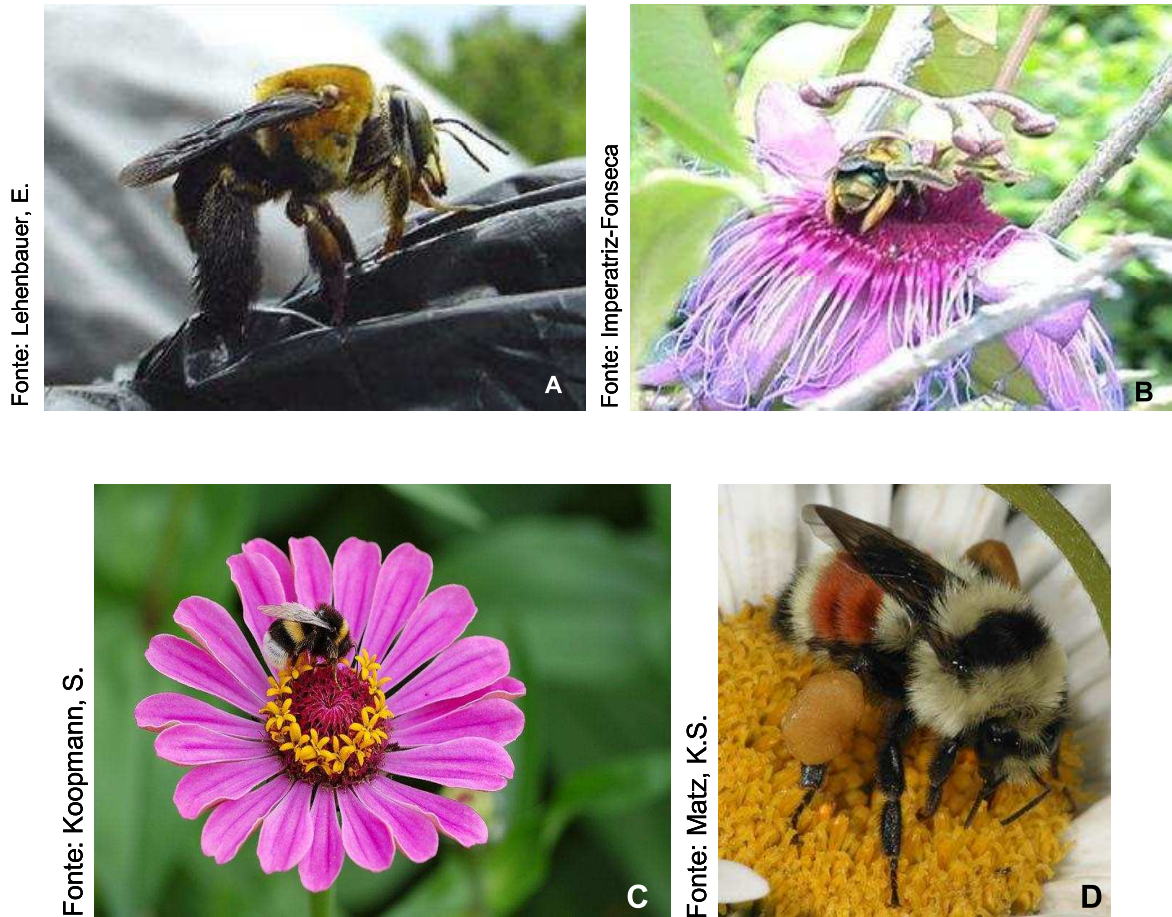


Figura 04- Espécies de abelhas polinizadoras de *T. ochracea*: espécies do gênero *Centris* (A e B), espécies do gênero *Bombus* (C e D).



Figura 05- Folha, flor, fruto e sementes de *T. ochracea*.

As árvores de *T. ochracea* são utilizadas, principalmente, para ornamentação, devido à beleza de suas flores amarelas, são utilizadas na recuperação de áreas

degradadas, devido a sua adaptação a terrenos secos (Lorenzi, 1992) e para arborização urbana. Produz madeira muito pesada, durável, utilizada para móveis, acabamentos externos ou internos e para confecção de peças torneadas (Pott & Pott, 1994; Lorenzi, 1992). Como planta medicinal é empregada para doenças venéreas e dos rins (Pott & Pott, 1994).

Apesar da grande importância e ampla distribuição, as espécies do gênero *Tabebuia* mais estudadas são da floresta Amazônica, principalmente sobre o aspecto da distribuição, polinização e fenologia (Gentry, 1974; 1990), os poucos estudos com espécies do cerrado e mata seca se referem à polinização (Barros 2001; Gibbs & Bianchi, 1993) e estudos envolvendo aspectos genéticos são inexistentes.

1.3 Microssatélites

Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para os estudos de biologia populacional como um todo. A variação encontrada entre espécies pode ser analisada diretamente em nível de DNA com uso de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Marcadores moleculares vêm sendo crescentemente utilizados para compreender estruturas genéticas de populações, fluxo gênico, viabilidade de populações, para quantificar os efeitos da fragmentação de habitats e serve como guia de estratégia de conservação (Collevatti et al., 2001a; 2001b; Gaiotto et al., 2003; Lemes et al., 2007; Zucchi et al., 2003).

Os microssatélites são marcadores moleculares compostos por pequenas seqüências de um a seis nucleotídeos que se repetem em *tandem* (lado a lado) e que foram descritos no mesmo ano por três grupos de pesquisadores (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989). O termo microssatélites se tornou a designação mais comum para este marcador, mas anteriormente também era conhecido como “short simple sequence” ou seqüências simples repetidas (Tautz, 1989) e STRs ou “short tandem repeats” (Edwards, 1991).

Os marcadores microssatélites são encontrados em muitos genomas, tanto em eucariotos quanto em procariotos (Tautz, 1989). Segundo Tautz (1989) um marcador microssatélites é encontrado a cada 10 kb em uma seqüência de DNA eucarioto. A unidade repetitiva do microssatélites é chamada de “motivo” e de

acordo com este o marcador poderá ser composto por mono-, di- e trinucleotídeos (Hamada et al., 1982; Wharton et al., 1985), mas microssatélites com mais nucleotídeos em repetição também são encontrados como os tetra- e pentanucleotídeos (Powell, 1996; Thode et al., 2002; Gordos et al., 2005). Em plantas, os microssatélites são encontrados a cada 50 kb, sendo o dinucleotídeo de maior frequência AT/TA e o trinucleotídeo TAT (Morgante & Olivieri, 1993). Em humanos a repetição de maior frequência é o dinucleotídeo AC/TG (Beckmann & Weber, 1992) e em procariotos, a repetição mais freqüente é A/T (van Belkun, 1998).

De acordo com Weber (1990) os microssatélites são classificados como perfeitos, imperfeitos ou compostos. Os microssatélites perfeitos consistem da repetição de um único motivo e não é interrompido por outro nucleotídeo que não pertença à repetição padrão. Os imperfeitos são aqueles em que a repetição é interrompida por um outro nucleotídeo, ou por uma seqüência, que originalmente não faz parte da estrutura repetidora. Os compostos consistem de dois ou mais microssatélites adjacentes com diferentes motivos repetidos em *tandem*. Os microssatélites são relativamente abundantes (cobrindo de maneira uniforme todo genoma), altamente variáveis, possui herança codominante (permitindo a distinção entre organismos homozigotos e heterozigotos), são baseados na técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*), o que requer, portanto, baixa quantidade de DNA, são robustos e de fácil reprodutibilidade (Powell et al., 1996). Além disso, marcadores microssatélites desenvolvidos para uma determinada espécie poderão ser utilizados em outras espécies taxonomicamente próximas (Schlotteröer et al., 1991), já que as regiões flaqueadoras complementares aos *primers* são conservadas entre espécies. Muitos microssatélites já foram desenvolvidos para espécies arbóreas tropicais tais como *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 2001a), *Copaifera langsdorffii* (Ciamp et al., 2000), *Jacaranda copaia* (Jones & Hubbell, 2003) e *Tabebuia aurea* (Braga et al., 2007).

Os microssatélites são descritos na maioria das vezes como marcadores neutros, tal fato está relacionado com a maior presença dessas seqüências em regiões não codificantes do genoma (Tautz et al., 1986). Contudo, eles ocorrem em regiões codificantes (Tautz et al., 1986; Tóth et al., 2000; Katti et al., 2001; Kantety et al., 2002; Morgante et al., 2002) e funções importantes têm sido atribuídas a eles,

tais como participação na recombinação e regulação gênica (Bending & Hentschel, 1983).

Esses marcadores são altamente polimórficos (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989). O alto polimorfismo está associado à alta taxa de mutação que ocorre nessas regiões, que varia de 10^{-2} a 10^{-6} , dependendo do organismo em questão (em *Escherichia coli* e *Drosophila melanogaster*, respectivamente) (Levinson & Gutman, 1987; Schug et al., 1998). Segundo Udupa & Baum (2001) a taxa de mutação dos microssatélites em plantas é maior do que em animais, devido a maior divisão celular em vegetais para produção de gametas. As altas taxas de mutação podem ser atribuídas a dois mecanismos. Um desses mecanismos é o processo de recombinação desigual (Smith, 1976, Jeffreys et al., 1994). Segundo Harding e colaboradores (1992) este é um processo que ocorre durante a meiose entre os cromossomos homólogos. De acordo com este mecanismo, a existência de unidades repetidas em *tandem* aumenta a probabilidade de que ocorra um alinhamento desigual entre as cromátides dos cromossomos homólogos. Este processo ocorre mais facilmente em longas seqüências, em que a maquinaria de recombinação não consegue promover o alinhamento corretamente (Smith, 1976). O outro mecanismo envolve o DNA “slippage”, ou seja, o deslizamento da DNA polimerase durante a replicação (Levinson & Gutman, 1987). Os deslizamentos da DNA polimerase nas regiões de microssatélites ocorrem devido ao seu avanço ou recuo durante a replicação, o que acarreta, respectivamente, em um aumento ou diminuição das unidades repetitivas. Como o realinhamento das fitas após a replicação se torna imperfeito, a mutação é originada. Segundo Schlotteröer e colaboradores (1991) os erros de deslizamento da DNA polimerase ocorrem mais facilmente em regiões com unidades repetitivas, como em microssatélites, quando comparadas a regiões não repetitivas. Entretanto, mecanismos de reparo como a ação de exonucleases e o “mismatch” pós-replicação corrigem muitos destes erros, o que evita novas mutações (Li et al., 2002).

Um conhecimento aprofundado sobre os eventos de mutação responsáveis pela evolução dos microssatélites é necessário para melhor compreensão das informações fornecidas por este marcador (Estoup & Cornuet, 1999). As mutações nos microssatélites geralmente envolvem a alteração no tamanho do mesmo quanto a uma unidade repetitiva. Contudo, as mutações também podem envolver muitas unidades repetitivas (Weber & Wong, 1993; Di Rienzo et al., 1994). Dentro dos

modelos mutacionais propostos existem aqueles que podem ser melhor aplicados aos microssatélites e a escolha do modelo é essencial, pois a estimativa de parâmetros populacionais, tais como, diferenciação genética e número de migrantes por geração, são dependentes do modelo assumido para esses marcadores (Estoup & Cornuet, 1999).

O modelo de alelos infinitos (*IAM-infinite allele model*), proposto por Kimura & Crow (1964) envolve a alteração de unidades repetitivas em *tandem* por meio de mutações pontuais em que o número possível de estados alélicos em um determinado loco pode ser extremamente grande e sempre irá resultar em um estado de alelo não encontrado previamente na população.

O modelo de mutação denominado modelo de mutação por passos (*SMM-stepwise mutation model*), foi proposto por Kimura e Otha (1978) e descreve que as mutações em microssatélites ocorrem pela perda ou ganho de apenas uma única unidade repetitiva, e, conseqüentemente, os alelos podem mudar para outros estados já existentes na população. O modelo de mutação de duas fases (*TPM-two phase model*) proposto por Di Rienzo e colaboradores (1994) também é aplicado aos microssatélites. De acordo com este modelo a maioria das mutações é introduzida pelo ganho ou perda de uma unidade repetitiva, mas também assume que mutações de maiores magnitudes, não muito freqüentes, também podem ocorrer. A mutação de uma unidade repetitiva (uma fase) ocorre com probabilidade igual a p e o alelo descendente tem probabilidade igual de ser uma unidade repetitiva maior ou menos do que o alelo antecessor. As mutações que envolvem mais unidades repetitivas (duas fases) ocorrem com probabilidade igual a $1-p$ e a mudança no número de unidades repetitivas é dada a partir de uma distribuição geométrica específica (g_j) que permite largas alterações no número destas unidades. No modelo TPM, bem como o SMM, as mutações podem levar à formação de alelos presentes previamente na população, são, portanto, alelos idênticos por estado e não por descendência. Entretanto, no modelo IAM dois alelos idênticos são obrigatoriamente idênticos por descendência.

Embora raramente citado outro modelo clássico pode ser considerado para os microssatélites. O modelo é denominado modelo de K alelos (*KAM-K-allele model*) e foi proposto por Crow e Kimura (1970). Sob este modelo existem exatamente K possíveis estados de alelos e qualquer alelo tem uma probabilidade constante $[\mu / K - 1]$ de mutação em direção a qualquer outro estado de alelo igual a $K - 1$.

1.4 Genética da Conservação

O processo de fragmentação, aliado à pressão antrópica, é o maior responsável pela perda da biodiversidade (Jordan et al., 2003). O desmatamento, uma das causas mais comuns de destruição do habitat, resulta na supressão de mais da metade das matas primárias ocorrentes nos países tropicais (Townsend et al., 2006). Além de sua rápida destruição, os habitats que anteriormente ocupavam grandes áreas são freqüentemente fragmentados em virtude das atividades antrópicas (Gilpin & Soulé, 1986; Frankham, 1995). Os resultados destes fatores são ecossistemas fragmentados, formando mosaicos de vegetação remanescente, mergulhados numa matriz antropizada. Nesse processo, grandes populações são reduzidas e subdivididas, o que pode acarretar alterações de processos ecológicos e genéticos (Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick et al., 1992; Nason & Hamrick, 1997), como na riqueza e composição de espécies (Murcia, 1995), no comportamento de polinizadores e dispersores, no sistema reprodutivo e no fluxo gênico (Gonçalves, 2006). A interação entre plantas e seus animais polinizadores também é afetada pela alteração do ambiente. Estudos evidenciaram que a fragmentação afeta de forma negativa o sucesso reprodutivo de plantas em ambientes tropicais (Cascente et al., 2001; Fuchs et al., 2003). Quesada e colaboradores (2004) verificaram que mudanças no sucesso reprodutivo das plantas têm acompanhado alterações na comunidade de seus polinizadores. Assim, a taxa de extinção de espécies está, provavelmente, no nível mais acelerado de toda história (Ricklefs, 2003). A fragmentação é uma causa importante de extinções locais de populações muito provavelmente, por causa da redução do tamanho populacional (Gilpin & Soulé, 1986) que, acompanhada de diminuição no fluxo gênico entre populações, leva a uma resposta mais acentuada de processos estocásticos, como a deriva genética, tendo como principais conseqüências o aumento da endogamia, uma maior diferenciação genética entre populações e uma perda de variação genética dentro de populações (Gilpin & Soulé, 1986; Frankham, 1996; Turner & Corlett, 1996). É preciso conhecer e prever as possíveis conseqüências da alteração de ambientes sobre as populações naturais para que possam ser desenvolvidas estratégias de conservação e manejo para prevenir prejuízos maiores às espécies como um todo (Turner & Corlett, 1996; Frankham et al., 2002).

Devido às elevadas taxas de destruição das comunidades naturais, massiva extinção de espécies é iminente e a conservação de recursos genéticos dos biomas tropicais é um dos tópicos mais prementes da atualidade. Tal fato tem promovido um aumento da demanda por informações científicas para aplicação na conservação de espécies nativas (veja Bacles et al., 2006; Cascante et al., 2002; Collevatti, et al., 2001a; Collevatti et al., 2007; Dick et al., 2003; Pandey et al., 2004; Sebbenn et al., 2000). Estudos ecológicos, demográficos e genéticos são as principais ferramentas utilizadas para determinar as prioridades de conservação de populações de plantas e animais silvestres.

A ciência da Genética da Conservação permite a elaboração e aplicação de estratégias de conservação que sejam efetivas na redução ou eliminação dos riscos de extinção, preservando a biodiversidade (Frankham et al., 2002; O'Brien, 1994). Esta ciência está relacionada com fatores genéticos que afetam os riscos de extinção e regime de manejo necessário para minimizar estes riscos (Frankham et al., 2002). Segundo Frankham e colaboradores (2002) a genética da conservação envolve, principalmente, 11 questões, dentre estas: efeitos deletérios causados por endogamia; perda de diversidade genética e capacidade de responder frente às mudanças ambientais; fragmentação de populações e redução do fluxo gênico; deriva genética imposta como principal força evolutiva ao invés da seleção natural; resolução de incertezas taxonômicas e definição de unidades de manejo.

A manutenção da diversidade genética é o principal foco da genética da conservação, pois é extremamente necessária para que a população seja capaz de responder às variações ambientais (Frankham et al., 2002). Além disto, a redução da variabilidade genética está associada com a endogamia e com a redução da reprodução e sobrevivência (valor adaptativo). Portanto, a diversidade genética é importante em longo prazo para manutenção do potencial adaptativo evolutivo, bem como em curto prazo, para manutenção do valor adaptativo (Frankham, 1996). A ausência de variação genética aumenta as chances de extinção de uma espécie (Frankham et al., 2002). Desta forma, a determinação dos níveis de variação genética e de como esta variação está distribuída dentro e entre populações naturais é fundamental, não apenas para o delineamento de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*, como também para a compreensão da história evolutiva das espécies (Awise et al., 1995; Frankham et al., 2002; O'Brien, 1994).

A redução do tamanho original da população e, conseqüentemente, do número total de indivíduos reprodutivos, pode proporcionar, em longo prazo, perda da diversidade genética nas populações remanescentes devido aos fatores associados com a endogamia e a deriva genética (Menges, 1991; Ellstrand & Elam, 1993).

A endogamia é o cruzamento entre indivíduos com ancestralidade relacionada, ou seja, aparentados. A endogamia inclui a auto-fecundação, que ocorre em muitas plantas, cruzamento entre irmãos e irmãs, pais e filhos, primos, etc. Nas pequenas populações a endogamia é inevitável e, com o passar do tempo, todos os indivíduos serão aparentados (Frankham et al., 2002). A endogamia conduz ao rápido declínio da variabilidade genética devido à redução de heterozigotos e ao aumento na incidência de doenças na população devido à maior presença de alelos deletérios e uma diminuição do sucesso reprodutivo dos indivíduos (número de descendentes de cada indivíduo) o que aumenta as chances de extinção da população (Frankham et al., 2002; Senner, 1980).

A diversidade genética pode ser reduzida também, mesmo em populações onde o acasalamento ocorra entre indivíduos não relacionados geneticamente, por um processo denominado deriva genética. A deriva genética é caracterizada pela flutuação aleatória das freqüências alélicas que promove a fixação de determinados alelos e a perda de outros (Franklin, 1980; Frankham et al., 2002).

Outra conseqüência da fragmentação é a ocorrência de gargalos genéticos populacionais. Este fenômeno ocorre devido à redução do tamanho populacional de forma intensa e repentina. Como resultado desta redução, a pequena população restante passa por um processo conhecido como efeito fundador, em que somente poucos indivíduos irão contribuir com a doação de genes nas próximas reproduções. Conseqüentemente, a nova população se inicia com baixa variabilidade genética, o que poderá ser agravada com a endogamia subsequente (Frankham et al., 2002).

1.5 Efeitos da Paisagem e Fluxo Gênico

A fragmentação de populações naturais depende crucialmente do fluxo gênico entre os fragmentos. O fluxo gênico tem sido amplamente discutido em relação à sua magnitude e influência na estrutura genética das populações. É uma força evolutiva que atua homogeneizando a variabilidade genética entre populações pelo

movimento de alelos de uma população para outra (Slatkin, 1995; Wright, 1951). A sua maior importância está na manutenção da diversidade genética e do polimorfismo. Além disso, contrapõem os efeitos da deriva genética. Uma das consequências da fragmentação é a limitação do fluxo gênico entre as populações que foram isoladas e/ou reduzidas (Frankham et al., 2002). Com isso, problemas como a redução da diversidade genética, aumento de efeitos deletérios causados por endogamia e deriva e aumento do risco de extinção, surgirão. Os impactos destes fatores na população fragmentada dependem do número de fragmentos, da distribuição das populações e seu tamanho nas manchas, das distribuições geográficas e espaciais das populações, da distância entre os fragmentos, da habilidade de dispersão das espécies, das taxas de migração entre os fragmentos e do tempo de fragmentação (Frankham et al., 2002). O fluxo gênico está, portanto, relacionado à estrutura das populações remanescentes após o evento de fragmentação ou de alteração do habitat. A detecção de uma descontinuidade genética, devido à ausência do fluxo gênico, é necessária para a compreensão de como o movimento de indivíduos, ou mesmo de gametas, influencia na estrutura genética de uma população (Manel et al., 2003).

A compreensão dos processos e padrões de fluxo gênico, bem como da adaptação local, requer um conhecimento detalhado de como as características da paisagem estruturam as populações (Manel et al., 2003). Esta compreensão é crucial, não somente por proporcionar um conhecimento ecológico, mas também para o manejo adequado da diversidade genética das populações (Manel et al., 2003).

Muitos estudos têm demonstrado redução do fluxo gênico entre populações em habitats que sofreram alterações. Dixon e colaboradores (2007) mostraram que em *Ursus americanus floridanus* a alteração do habitat provocada pela fragmentação e construção de estradas promoveu a diferenciação de populações deste mamífero pela redução do fluxo gênico entre os indivíduos de diferentes populações. Este mesmo resultado foi observado em besouros (*Carabus violaceus*, Keller & Largiadèr, 2003) também como consequência da alteração do habitat pela construção de estradas. No anfíbio *Hyla arborea* foi observada perda da diversidade genética e aumento da endogamia devido à redução do fluxo gênico entre populações isoladas pela fragmentação (Andersen et al., 2004). A alteração de habitats naturais devido à expansão agrícola também provocou redução da diversidade genética e aumento da

diferenciação entre populações de borboletas (*Speyeria idalia*) devido à redução do fluxo gênico (Williams et al., 2003). Em plantas foi demonstrada redução da diversidade genética, efeito de gargalo genético e aumento da endogamia em populações de *Trillium camschatcense* em habitats alterados também pela expansão agrícola e construção de estradas (Tomimatsu & Ohara, 2003). Honnay & Jacquemynn (2006) realizaram uma meta-análise e evidenciaram os efeitos deletérios das alterações de habitat na diversidade genética de plantas raras e comuns. Os autores ressaltam que esses efeitos, como a redução do fluxo gênico, são tão intensos em plantas comuns quanto em plantas raras, o que evidencia que as alterações do habitat causam problemas também para espécies que não estão em risco de extinção.

Em espécies arbóreas tropicais as consequências das alterações do habitat também já foram descritas. Em *Pachira quinata* árvores presentes em habitat contínuo produziram mais frutos do que árvores isoladas e as progênies de indivíduos presentes no habitat contínuo apresentaram menores índices de parentesco, indicando acasalamento aleatório entre esses indivíduos (Fuchs et al., 2003). Em *Samanea saman* foi observado maior coeficiente de endogamia em árvores isoladas do que em árvores em habitat contínuo e a análise genética das progênies mostra uma maior similaridade genética entre as progênies de árvores isoladas (Cascante et al., 2002). Aldrich & Hamrick (1998) observaram um aumento da endogamia em árvores de *Symphonia globulifera* presente em pastos. Dick e colaboradores (2003) mostraram que em habitats contínuos árvores de *Dinizia excelsa* eram polinizadas por abelhas e besouros nativos enquanto que árvores localizadas em habitats alterados eram polinizadas por abelhas exóticas (*Apis mellifera scutellata*), evidenciando os efeitos das alterações do habitat também nos polinizadores das espécies arbóreas. Apesar disso, outros estudos não evidenciaram efeitos desta natureza em espécies arbóreas. Em *Caryocar brasiliense* nenhum efeito da alteração do habitat foi detectado na heterozigosidade ou no coeficiente de endogamia desta espécie (Collevatti et al., 2001a). Herrerías-Diego e colaboradores (2006) não encontraram efeito da alteração do habitat no sucesso reprodutivo de *Ceiba aesculifolia*. Os autores sugerem que o fluxo gênico entre as populações é mantido graças a grande mobilidade de seu polinizador (morcegos). Apsit e colaboradores (2001) observaram que as alterações do habitat não foram

capazes de formar barreiras ao fluxo gênico entre populações de *Enterolobium cyclocarpum*.

A descontinuidade genética pode estar associada também às características físicas da paisagem, tais como barreiras geográficas ao fluxo gênico pela presença de montanhas, gradiente de umidade, rios, entre outros (Manel et al., 2003). Funk e colaboradores (2005) observaram que cadeias de montanhas restringiram o fluxo gênico entre indivíduos do anfíbio *Rana luteiventris* provocando um aumento da diferenciação genética entre populações desta espécie. Na salamandra tigre (*Ambystoma tigrinum melanostictum*) foi observado que a distância e a altitude são características da paisagem que promovem uma diminuição do fluxo gênico (Spear et al., 2005).

Outra característica da paisagem que atua como barreira ao fluxo gênico é o rio. Wallace (1852) observou que os rios da Bacia Amazônica poderiam atuar como barreiras ao fluxo gênico entre populações de macacos presente em margens opostas. Muitos estudos foram realizados com a fauna tropical para testar essa hipótese e dados de estudos realizados com diferentes táxons corroboram esta hipótese. Em primatas, por exemplo, foi observado que o rio Tocantins atua como uma efetiva barreira ao fluxo gênico entre populações de *Saguinus niger* (Vallinoto et al., 2006). Este mesmo resultado foi observado em lagartos (*Liolaemus monticola*) presentes em margens opostas do rio Aconcágua e seus afluentes (Lamborot et al., 1991). Entretanto, Gascon e colaboradores (1996) observaram que o rio Juruá não atua como barreira geográfica ao fluxo gênico entre populações de sapos (*Vanzolinius discodactylus* e *Epipedobates femoralis*, Loughheed et al., 1999) localizadas em margens opostas, bem como para outras espécies de sapos e pequenos mamíferos (Gascon et al., 2000).

Estudos com plantas também mostram que rios podem atuar como barreiras geográficas ao fluxo gênico entre populações em margens opostas. Pinto e colaboradores (2004) observaram que o rio Capivari atua como barreira ao fluxo gênico entre populações de *Copaifera langsdorffii* localizadas em margens opostas. A ausência de fluxo gênico proporcionou uma alta diferenciação genética entre essas populações ($\theta=0,175$). Tero e colaboradores (2003) encontraram diferenciações genéticas em populações de *Silene tatarica* separadas pelo rio Oulankajoki na Finlândia e na Rússia, evidenciando que o rio pode atuar como barreira ao fluxo gênico entre populações desta espécie. Contudo, diferenças

genéticas e ausência de fluxo gênico entre populações de *Primula sieboldii* separadas por vários rios na Universidade de Tsukuba, Japão não foram observadas, mostrando que para esta espécie o rio não atua como barreira geográfica (Kitamoto et al., 2005).

Devido às suas características reprodutivas e demográficas, árvores tropicais são particularmente vulneráveis às características do habitat a qual estão inseridas. A maioria das espécies arbóreas tropicais ocorre em baixa densidade, depende de animais para realizar a polinização e dispersão de suas sementes, apresenta altas taxas de fecundação cruzada e sistemas reprodutivos que envolvem complexos mecanismos de auto-incompatibilidade (Bawa, 1974; Hamrick & Murawski, 1990). Porém, estudos desta natureza com árvores de matas secas são escassos (mas veja Apsit et al., 2001; Cascante et al., 2002; Naciri et al., 2006). Dessa forma, o estudo da estrutura genética e de fluxo gênico de espécies de matas secas é de suma importância para a compreensão da evolução destas espécies e para avaliar a probabilidade de persistência das espécies nos remanescentes, dando subsídios para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo sustentável.

2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da paisagem sobre o fluxo gênico e estrutura genética de *T. ochracea* (Bignoniaceae) nas matas secas do norte de Minas Gerais, contribuindo para o melhor entendimento da evolução e dos efeitos da alteração do habitat e de barreiras geográficas na espécie de matas secas, dando subsídios para a conservação da árvore e da formação florestal na qual está inserida. Assim foram testadas as seguintes hipóteses em populações de *T. ochracea*:

- i. o rio São Francisco atua como uma barreira geográfica ao fluxo gênico entre populações de margens opostas;
- ii. a alteração das matas secas promove a redução da diversidade genética em populações estabelecidas após este evento;

3. Material e Métodos

3.1 Caracterização da Área de Estudo

3.1.1 Parque Estadual da Mata Seca

Este estudo foi realizado no Parque Estadual da Mata Seca (PEMS), criado em 2000 com 10.281,44 hectares (ha), sob a responsabilidade do Instituto Estadual de Floresta (IEF) de Minas Gerais (Figura 06). Este parque está localizado no Vale do Médio São Francisco no município de Manga, mas está separado do município de Matias Cardoso apenas pelo Rio São Francisco (IEF, 2000). Além disso, está a apenas 8 Km do município de São João das Missões. Desta forma, sua zona de influência abrange três municípios cuja população total é de aproximadamente 40.000 habitantes.

Em Minas Gerais, o PEMS é a única unidade de conservação na margem esquerda do rio São Francisco que possui matas secas em solo não-cárstico (chamada também de caatinga arbórea) e mata ciliar ainda preservada nas margens deste rio (IEF, 2000). A cobertura vegetal da área é composta por formações distintas, predominantemente caducifólias, inserindo-se na ampla faixa transicional entre os domínios do Cerrado e da Caatinga. Entre as formações decíduas e semidecíduas, são encontradas florestas sub-caducifólias em terrenos mais altos ao longo dos rios, florestas caducifólias em solos litólicos, que se assemelham à formações de Mata Atlântica empobrecidas, e florestas caducifólias em solos podzólicos, latossolos e cambissolos, que possuem espécies arbóreas da caatinga de grande porte. Ao longo dos rios, geralmente em partes mais baixas, destacam-se florestas perenifólias que recobrem porções significativas da várzea do rio São Francisco e normalmente fazem fronteira com as florestas sub-caducifólias (IEF, 2000).

O histórico de uso antrópico do PEMS inclui o estabelecimento de dois pivôs centrais de cerca de 100 ha cada, para o cultivo de feijão e milho. Entretanto, a principal atividade nesta área era a criação de gado. Cerca de 1.525 ha da área do PEMS são constituídos por pastagens abandonadas em diferentes estágios de regeneração (IEF, 2000). Entretanto, existem grandes extensões de pastagens nas vizinhanças do PEMS, o que pode trazer problemas como invasão de gado e

passagem de fogo. Além disso, a margem do São Francisco dentro do PEMS localizada em frente ao município de Matias Cardoso está ocupada como ponto de apoio à pesca. Desta forma, existem assentamentos ilegais dentro do PEMS, acarretando o desmatamento das matas ciliares do rio São Francisco nestas áreas.

3.1.2 Parque Estadual Lagoa do Cajueiro

O presente estudo também foi realizado no Parque Estadual Lagoa do Cajueiro (PELC), criado em 1998 com 20.500 hectares, também sob a responsabilidade do IEF de Minas Gerais (IEF, 2007). O PELC está localizado no Vale do Médio São Francisco no município de Matias Cardoso. Assim sendo, os parques estão separados apenas pelo Rio São Francisco, que no local possui 600 metros de largura (Figura 06).

O PELC é a uma unidade de conservação à margem direita do rio São Francisco e possui uma cobertura vegetal que também se insere na ampla faixa transicional entre os domínios do Cerrado e da Caatinga.

A principal atividade antrópica do PELC era a criação de gado. Atualmente, são encontrados no parque áreas de pastos artificiais em estágio de recomposição natural. Entretanto, existem grandes extensões de pastagens nas vizinhanças do PELC, o que também pode trazer problemas como invasão de gado e passagem de fogo, como ocorre no PEMS. Ao redor do parque está localizado o Projeto Jaíba, que tem como objetivo a implantação de uma agricultura moderna na região. Assim, na década de 80 a irrigação foi implantada em cerca de 25 mil hectares de terra, constituindo aproximadamente 200 Km de canais, para levar a água do São Francisco até os lotes irrigáveis.

Segundo a classificação de Köppen, o tipo de clima predominante na região dos parques é o Aw, caracterizado pela existência de uma estação seca bem acentuada no inverno. Neste tipo climático, há pelo menos um mês com precipitação inferior a 60 mm e a temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C. A temperatura média anual é de 24°C e o índice pluviométrico é de 871 mm (Antunes, 1986).

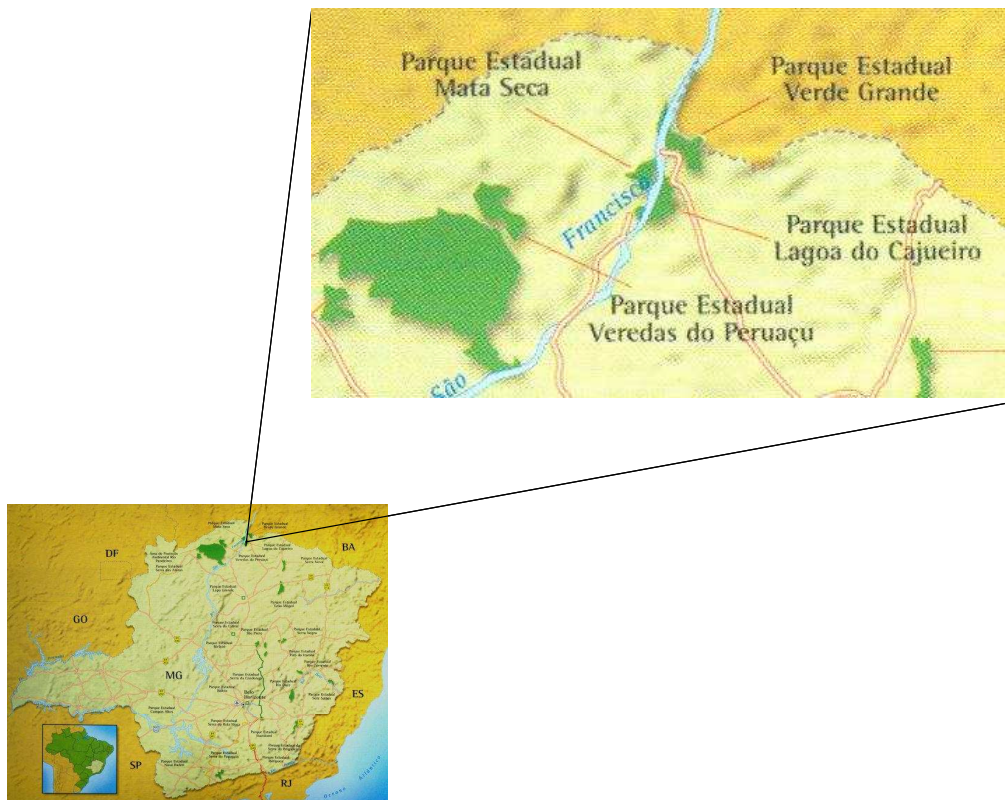


Figura 06- Parques Estaduais do Estado de Minas Gerais, em destaque PEMS e PELC.

3.2 Coleta do Material Vegetal

Os indivíduos de ipê foram coletados em parcelas de 1000 m² (20 × 50 m) nas áreas de estudo, três parcelas presentes no PEMS e uma parcela no PELC. Cada parcela corresponde a uma população e estão nomeadas da seguinte forma: PEMS 1, PEMS 2, PEMS 3 e PELC 1 (Figuras 07 e 08).

Todos os indivíduos, adultos e juvenis, das populações foram identificados com placas correspondentes, tiveram seu tecido foliar coletado para análise genética e coordenadas geográficas registradas com o uso do Sistema de Posicionamento Global (GPS). A população PEMS 1 encontra-se à margem esquerda do rio São Francisco em um área conservada (ver Madeira, 2008). Nesta população foram coletados 112 indivíduos, sendo 56 adultos e 56 juvenis. A população PEMS 2 encontra-se à margem esquerda do rio São Francisco e em uma área perturbada

devido a ações antrópicas. Nesta população foram coletados 30 indivíduos, sendo 24 adultos e seis juvenis. A população PEMS 3 encontra-se à margem esquerda do rio São Francisco em uma área alterada também pela ação do homem. Nesta população foram coletados 89 juvenis. Apenas indivíduos juvenis foram coletados devido ao recente estabelecimento desta nova população. Esta população está localizada em uma área a qual foi utilizada para pastagem até o ano 2000 (ver Madeira, 2008). A população PELC 1 encontra-se à margem direita do rio São Francisco e em estágio em uma área perturbada. Nesta população foram coletados 70 indivíduos, sendo 21 adultos e 49 juvenis.



Figura 07- Locais de coleta: A) PEMS 1, B) PEMS 2, C) PEMS 3 e D) PELC.

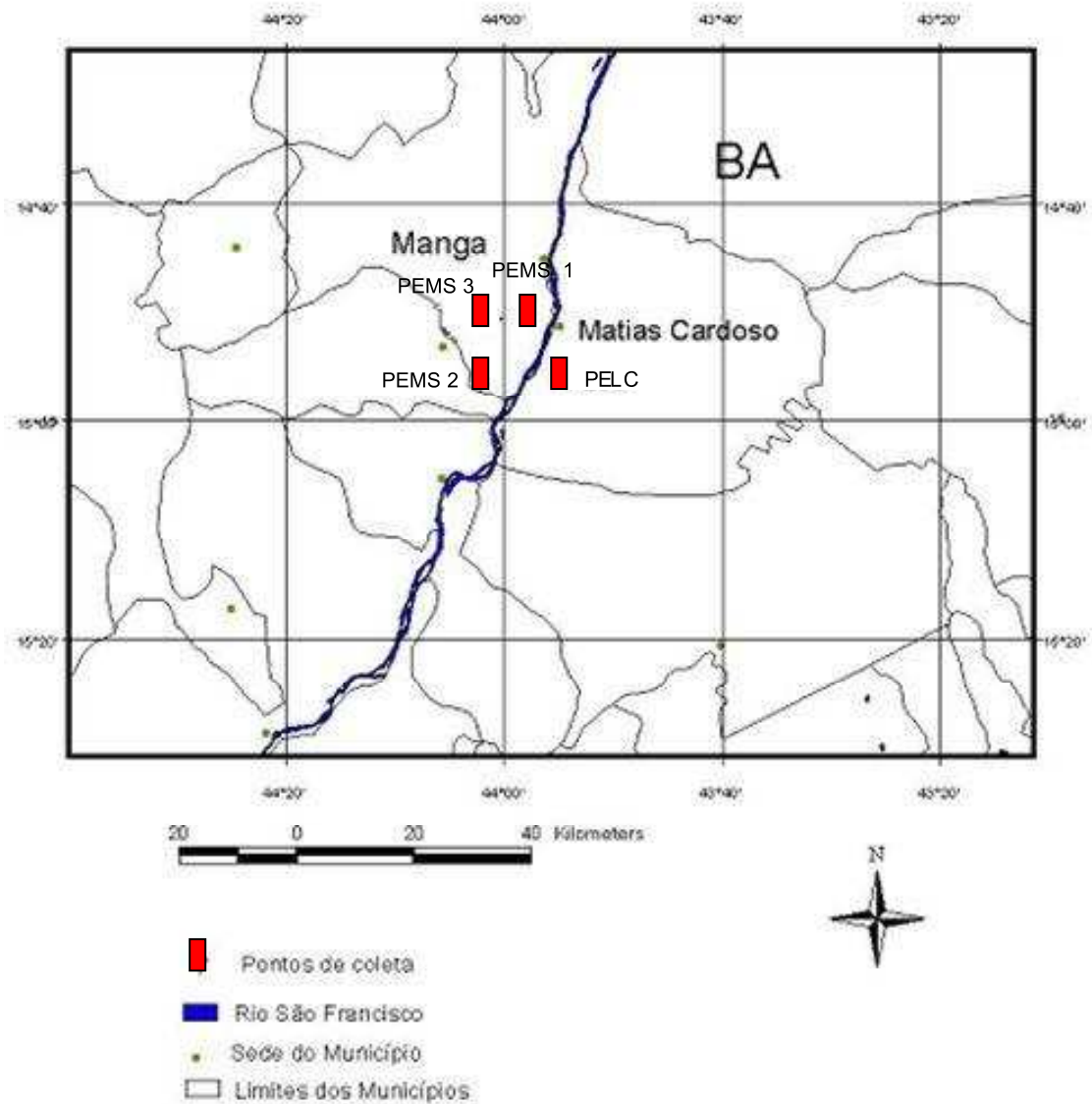


Figura 08- Localização das populações coletadas em áreas de matas secas.

Para caracterização dos locos microssatélites foram coletados indivíduos de *T. ochracea* pertencentes a uma outra população. Foram coletados 19 indivíduos adultos na Estação Ecológica de Águas Emendadas, no município de Planaltina, Distrito Federal. O estudo desses indivíduos é necessário para verificarmos se o resultado da variabilidade genética observada nas populações de *T. ochracea* das matas secas é resultante da transferibilidade dos locos microssatélites

desenvolvidos para *T. aurea* ou corresponde à verdadeira diversidade existente nessas populações.

3.3 Extração de DNA genômico, transferibilidade, amplificação dos locos microssatélites e genotipagem

Para obtenção das amostras de DNA foi utilizado o tecido foliar de cada indivíduo. A extração do material genético foi realizada de acordo com o procedimento padrão do CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987).

Em seguida, quatro indivíduos foram utilizados para testar a transferibilidade de 21 pares de iniciadores (*primers*) de locos microssatélites desenvolvidos para *Tabebuia aurea* por Braga e colaboradores (2007).

As reações de PCR possuíam volume final de 10 μ L, contendo 1,0 μ M de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Phoneutria, MG), 250 μ M de cada dNTP, 1X do tampão (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,25 mg de BSA e 3,0 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em termocicladores GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA) nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 minuto, de 48 a 62°C por 1 minuto (de acordo com a temperatura de anelamento de cada *primer*), 72°C por 1 minuto (30 ciclos); e 72°C por 60 minutos (1 ciclo de anelamento final para adição de adenina nos fragmentos amplificados). Os produtos das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 3,0 % corado com brometo de etídeo 1mg/mL.

Os *primers* que apresentaram produtos de amplificação único e de tamanho esperado foram utilizados para genotipagem de todos os indivíduos de *T. ochracea*. Os locos microssatélites foram caracterizados quanto ao número de alelos e intervalo de tamanho dos alelos obtidos. Os *primers* foram marcados com fluorescência 6-FAM (azul), HEX (amarelo) e NED (verde). Os produtos das amplificações foram diluídos 1:5 ou 1:10, quando necessário, e foi adicionado 1,0 μ L do padrão interno GeneScan 500 internal lane standard (ROX, Perkin-Elmer, CA) e 8,0 μ L formamida deionizada para genotipagem. Os produtos das amplificações foram então aquecidos a 95°C por cinco minutos e colocados em gelo imediatamente para desnaturação e submetidos à eletroforese em seqüenciador

automático ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, CA). Os fragmentos foram analisados automaticamente para atribuição de tamanho usando os programas Genescan v. 3.7.1. e Genotyper v. 3.7 (Applied Biosystems, CA).

3.4. Caracterização dos Locos Microssatélites

Para a caracterização dos locos microssatélites transferidos para *T. ochracea* foram utilizados os indivíduos adultos das populações PEMS 1, PEMS 2, PELC, bem como os indivíduos adultos da população de *T. ochracea* da Estação Ecológica de Águas Emendadas. Para a caracterização dos locos foram utilizados 120 indivíduos. Foram estimados o número de alelos por loco (A), a heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação de Wright (f), utilizando o programa Genetic Data Analysis - GDA 1.1 (Lewis & Zaykin, 2001). O desvio de Hardy-Weinberg foi testado utilizando o programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Além disso, os pares de locos foram testados para o desequilíbrio de ligação também com uso do programa Fstat 2.9.3.2 com correção de Bonferroni (Goudet, 2002).

A probabilidade de identidade genética (I) (Chakravarat & Li, 1983) bem como a probabilidade de exclusão de paternidade (Q) (Weir, 1996) foram estimadas. A probabilidade de identidade genética corresponde à probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso apresentarem o mesmo genótipo e a probabilidade de exclusão de paternidade corresponde ao poder de excluir um falso candidato à paternidade escolhido ao acaso. As probabilidades combinadas de exclusão de paternidade, $QC = 1 - [\Pi(1 - Qi)]$, e de identidade genética, $IC = \Pi I_i$, também foram mensuradas.

3.4.1 Análise da Genotipagem – Evidências de alelo nulo, “stutter” e “dropout” de alelos

A análise de microssatélites envolve eventuais problemas causados por três principais artefatos relacionados à detecção via PCR. Estes artefatos são conhecidos com “alelo nulo”, “stutter” e “dropout” e podem subestimar a frequência de heterozigotos.

O “alelo nulo” ocorre devido a mutações nas seqüências flangeadoras impedindo o anelamento do *primer* o que torna impossível a detecção do alelo em

questão (Paetkau et al., 1995). O deslizamento da DNA polimerase durante a replicação forma produtos denominados “stutter” (Hauge, 1993), que são fragmentos que possuem uma ou mais unidades repetitivas a menos do que o alelo verdadeiro. A presença desses produtos pode comprometer a análise já que o “stutter” pode ter tamanho semelhante a um alelo. O “dropout”, ou “short allele dominance” refere-se à amplificação preferencial de alelos menores (Wattier et al., 1998). Devido à natureza competitiva da PCR, alelos menores amplificam em maior quantidade, conseqüentemente, em muitos casos de indivíduos heterozigotos, somente o alelo menor é detectado e o indivíduo é considerado homozigoto.

Para verificar se existem evidências da presença de “alelos nulos”, “stutter” e “dropout” de alelos nos genótipos de *T. ochracea* foi utilizado o programa Micro-Checker 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004), baseando-se em 1.000 randomizações, com intervalo de confiança de 95% (Goudet et al., 1996).

3.5. Barreira Geográfica

Para testarmos se o rio São Francisco atua como uma barreira geográfica ao fluxo gênico entre populações de *T. ochracea* localizadas em margens opostas foram selecionadas as seguintes populações: PEMS 1, PEMS 2 e PELC.

A população PEMS 1 encontra-se a margem esquerda do rio São Francisco enquanto que a população PELC localiza-se a margem direita do rio São Francisco. Estas populações possuem 10 Km de distância. A população PEMS 2 também está localizada a margem esquerda do rio São Francisco e situada a 8 Km de distância da PEMS 1. A distância entre as populações PELC e PEMS 2 é de aproximadamente 12 Km. O estudo da população PEMS 2 é necessário para averiguarmos se a possível barreira ao fluxo gênico é devido à presença do rio ou somente à distância que as separa (Tabela 01).

Tabela 01 – Características das populações amostradas de *T. ochracea* (os nomes das populações são dados no texto).

População	Área (ha)	Status de Conservação	Área amostrada (m ²)	N	J (%)
PEMS 1	10.281,44	Conservada	1.000	112	50,0
PEMS 2	10.281,44	Alterada	1.000	30	20,0
PELC	20.500	Alterada	1.000	70	70,0

N -número de indivíduos amostrados em cada área; J – porcentagem de juvenis amostrados em cada área.

A diversidade genética foi mensurada com a obtenção do número de alelos por população (A), heterozigosidade esperada (He) sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidade observada (Ho) e o índice de fixação de Wright (f), no programa Genetic Data Analysis - GDA 1.1 (Lewis & Zaykin, 2001). O desvio de Hardy-Weinberg foi testado por meio de teste de permutação com correção de Bonferroni utilizando o programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

Para verificar se as populações apresentam diferenciação a estrutura genética foi estimada a partir dos coeficientes de coancestralidade de Weir & Cockerham (1984). Os coeficientes foram estimados a partir da variância das freqüências alélicas dos indivíduos, sendo $F=F_{IT}$ (coeficiente de endogamia total), $f=F_{IS}$ (coeficiente de endogamia), $\theta=F_{ST}$ (índice de fixação), utilizando o programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002), baseado em 1.000 randomizações, com o nível de significância de $p \leq 0,05$ com correção de Bonferroni (Goudet et al., 1996). Uma vez que a maioria das mutações que ocorrem nos microssatélites envolve a adição ou deleção de uma unidade repetitiva, segundo o modelo SMM (Kimura e Ohta, 1978), a diferenciação genética entre as populações também foi estimada pelo índice R_{ST} (Slatkin, 1995). O R_{ST} é obtido pela análise de variância do tamanho dos alelos e pode ser interpretado como uma correlação do tamanho dos alelos de diferentes indivíduos de uma mesma população. Este índice é análogo ao θ , com exceção que para o θ a correlação entre as freqüências alélicas de diferentes indivíduos na mesma população considera alelos idênticos por descendência, segundo o modelo IAM (Cockerham, 1969; Kimura & Crow, 1964; Weir & Cockerham, 1984). A análise de diferenciação estimada pelo R_{ST} foi realizada segundo Goodman (1997) utilizando o programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002). A significância do teste de

diferenciação foi estimada pela randomização dos genótipos entre as amostras para obtenção da estatística G log-likelihood (Goudet et al., 1996).

Além disso, para verificar se os indivíduos das três populações pertencem a um mesmo pool gênico e testar a existência de estruturação genética foi utilizada a análise Bayesiana utilizando o programa Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000). Este programa utiliza o método Bayesiano de agrupamento para encontrar grupos dentro das populações que minimizem desequilíbrios de ligação e de Hardy-Weinberg sem informação espacial *a priori*.

O fluxo gênico aparente (Nm) entre as populações foi estimado de forma indireta segundo metodologia proposta por Wright (1951) que considera o número de migrantes (Nm) e a divergência genética (F_{st}) entre as populações. Foi utilizado o cálculo de modelo de ilhas proposto por Crow & Aoki (1984), o qual corrige a análise para pequeno número de populações: $Nm = (1/4\alpha)[(1/F_{st})-1]$, sendo, $\alpha = [n/(n-1)]$ a correção para o número de populações (n). Entretanto, foi utilizado o valor de θ como estimador de divergência genética entre as populações para estimação do fluxo gênico não viesada, conforme Weir & Cockerham (1984).

Os coeficientes de coancestralidade (θ_{xy}) entre pares de indivíduos foram estimados a partir dos coeficientes de parentesco (r_{xy}) entre os pares de indivíduos, conforme estabelecido por Queller e Goodnight (1989). Os coeficientes de parentesco (r_{xy}) foram estimados utilizando o programa Mark 2.0 (Ritland, 2004).

Para verificar se indivíduos pertencentes a populações de uma mesma margem do rio São Francisco são mais relacionados geneticamente do que indivíduos pertencentes a populações de margens opostas foram utilizados os modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição de erros normal (Crawley 2002) utilizando o programa estatístico R 2.6.1 (R Development Core Team 2006). Em seguida, foi realizada uma análise de resíduo para verificar a adequação dos dados à distribuição de probabilidade assumida. Assim foram utilizados os coeficientes de parentesco entre os pares de indivíduos entre as populações (PELC, PEMS 1 e PEMS 2) como variável resposta e a localização das populações a qual os indivíduos pertencem (mesma margem ou margem oposta) como variável explicativa.

3.6 Alteração do Habitat

Para testarmos se a alteração do habitat promove diminuição na diversidade genética e aumento de parentesco na nova população de *T. ochracea* estabelecida após este evento foram selecionadas as populações PEMS 1 e PEMS 3. A população PEMS 1 foi selecionada pois encontra-se em uma área conservada e não existem registros de perturbações neste local (veja Madeira, 2008). A população PEMS 3 foi selecionada por estar em uma área alterada, a qual foi utilizada até o ano 2000 como pasto para criação de gado (veja Madeira, 2008) (Tabela 02).

Tabela 02 – Características das populações amostradas de *T. ochracea* (os nomes das populações são dados no texto).

População	Área (ha)	Status de Conservação	Área amostrada (m ²)	N	J (%)
PEMS 1	10.281,44	Conservada	1.000	112	50.0
PEMS 3	10.281,44	Alterada	1.000	89	100.0

N -número de indivíduos amostrados em cada área; J – porcentagem de juvenis amostrados em cada área.

A diversidade genética foi mensurada com a obtenção do número de alelos por população (A), heterozigosidade esperada (He) e heterozigosidade observada (Ho) sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação de Wright (f), no programa Genetic Data Analysis - GDA 1.1 (Lewis & Zaykin, 2001). O desvio de Hardy-Weinberg foi testado por meio de teste de permutação com correção de Bonferroni utilizando o programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

A estrutura genética foi estimada a partir dos coeficientes de coancestralidade de Weir & Cockerham (1984). Os coeficientes foram estimados a partir da variância das frequências alélicas dos indivíduos, sendo $F=F_{IT}$ (coeficiente de endogamia total), $f=F_{IS}$ (coeficiente de endogamia), $\theta=F_{ST}$ (índice de fixação), utilizando o programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002), baseado em 1.000 randomizações, com o nível de significância de $p \leq 0,05$ corrigidas pelo teste de Bonferroni (Goudet et al., 1996). A diferenciação genética entre as populações também foi estimada pelo R_{ST} (Slatkin, 1995).

Além disso, para verificar se os indivíduos das duas populações pertencem a um mesmo pool gênico e testar a existência de estruturação genética foi utilizada a análise Bayesiana utilizando o programa Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000).

Para verificar se a diversidade genética populacional encontrada reflete uma possível redução drástica das populações foi realizada a análise com o programa Bottleneck versão 1.2.02 (Piry et al., 1999). A análise testa se as populações estão sob o equilíbrio mutação-deriva, conforme metodologia descrita em Cornuet & Luikart (1996). Estes testes baseiam-se no princípio de que populações que experimentaram uma recente redução de seu tamanho populacional exibem uma redução do número de alelos e heterozigosidade esperada pelo equilíbrio mutação-deriva (H_{eq}). O número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), o que faz com que H_e se torne maior do que a heterozigosidade esperada sob o equilíbrio mutação-deriva (H_{eq}) (Cornuet & Luikart, 1996; Piry et al., 1999). A heterozigosidade nunca se refere à proporção de heterozigotos observada (H_o). Com isso, não se está testando para um excesso de heterozigotos ($H_o > H_e$) e sim para um excesso de heterozigosidade ($H_e > H_{eq}$).

As análises de heterozigosidade dos locos, sob a hipótese do equilíbrio de mutação e deriva, foram conduzidas a partir dos modelos de mutação “Stepwise Mutation Model” – SMM e “Two-phase Mutation Model” – TPM, na proporção 70% para o modelo SMM e 30 % para o modelo TPM. A redução significativa na heterozigosidade foi realizada pelo teste estatístico não-paramétrico de Wilcoxon, por ser o mais robusto quando utilizado para poucos locos (< 20 ; Piry et al., 1999), baseando-se em 1.000 replicações.

Os coeficientes de coancestralidade (θ_{xy}) entre pares de indivíduos foram estimados a partir dos coeficientes de parentesco (r_{xy}) entre os pares de indivíduos, conforme estabelecido por Queller e Goodnight (1989). Os coeficientes de parentesco (r_{xy}) foram estimados utilizando o programa Mark 2.0 (Ritland, 2004).

Para verificar se indivíduos pertencentes a uma população formada após modificações do habitat são mais relacionados geneticamente do que indivíduos pertencentes a uma população sem alterações antrópicas foram utilizados os modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição de erros normal (Crawley 2002) utilizando o programa estatístico R 2.6.1 (R Development Core Team 2006). Em seguida, foi realizada uma análise de resíduo para verificar a adequação dos dados à distribuição de probabilidade assumida. Assim foram utilizados os coeficientes de parentesco entre os pares de indivíduos em cada população como

variável resposta e a população a qual os indivíduos estão localizados (PEMS 1 e PEMS 3) variável explicativa.

4. Resultados

4.1 Caracterização dos locos microssatélites

Dos 21 *primers* testados, sete foram selecionados para a genotipagem dos indivíduos de *T. ochracea* por apresentarem claros produtos de amplificação sem presença de bandas inespecíficas. Os locos microssatélites analisados apresentaram produtos de amplificação dentro do intervalo observado em *T. aurea*, espécie para qual os microssatélites foram desenvolvidos, com exceção do *primer* Tau 30 (Tabela 03).

Tabela 03 – Descrição dos locos microssatélites desenvolvidos para *Tabebuia aurea* (Braga et al., 2007) e utilizados em *Tabebuia ochracea*.

Locos	Repetição do motivo	Tamanho do Fragmento e Amplitude dos Alelos (pb)*	T _a (°C)
Tau 07	(AG) ₂₅	270 140-158 (142-204)	58°C
Tau 12	(TC) ₈ (TA) (TG) ₂₉	180 114-162 (146-212)	50°C
Tau 15	(AG) ₃₂	151 106-134 (104-166)	52°C
Tau 17	(GA) ₇ (GC)(GA) ₃ (GC) ₅ (GA) ₂₁ (GGGAGG)(GA) ₇	222 108-180 (148-240)	52°C
Tau 28	(CT) ₃₃	186 128-134 (140-190)	52°C
Tau 30	(TC) ₂₃	244 116-128 (216-249)	62°C
Tau 31	(CT) ₂₈ (CA) ₁₀ (CTT)(GT) ₅	265 242-256 (210-270)	60°C

*- Intervalo entre o tamanho mínimo e máximo do alelo em pares de bases (pb) observado para *T. ochracea* e para *T. aurea* (entre parênteses); Ta-temperatura de anelamento dos *primers* em *T. ochracea*.

O número médio de alelos por loco foi de 6,28, variando de quatro alelos (Tau 28 e Tau 30) a nove alelos (Tau 07) (Tabela 04). A heterozigosidade média esperada foi igual a 0,478. O loco Tau 30 apresentou a maior heterozigosidade esperada (0,607) e o loco Tau 28 apresentou a menor (0,236). A heterozigosidade média observada foi igual a 0,348. O loco Tau 30 apresentou a maior heterozigosidade observada (0,722) e o loco Tau 12 apresentou a menor (0,151) (Tabela 04). A heterozigosidade observada foi menor que a esperada para todos os locos, com exceção do loco Tau 30, o que resultou em valores positivos e significativos de f (Tabela 04). Todos locos microssatélites selecionados não apresentaram desequilíbrio de ligação (Tabela 05). A probabilidade combinada de exclusão da paternidade apresentou um valor alto e a probabilidade combinada de identidade genética apresentou valor baixo (Tabela 04).

Tabela 04 – Caracterização dos locos microssatélites para 120 indivíduos adultos de *Tabebuia ochracea* de quatro populações.

Loco	A	He	Ho	f	Q	I
Tau 07	9	0,516	0,341	0,478*	0,317	0,0005
Tau 12	5	0,588	0,151	0,698*	0,383	0,0000
Tau 15	9	0,417	0,317	0,253*	0,282	0,0012
Tau 17	6	0,515	0,512	0,075	0,260	0,0013
Tau 28	4	0,236	0,211	-0,039	0,128	0,0426
Tau 30	4	0,607	0,722	-0,181	0,354	0,0002
Tau 31	7	0,470	0,181	0,563*	0,261	0,0018
Para todos os locos	6,28	0,478	0,348	0,283*	QC=0,9073	IC=7,655x10 ⁻²²

A – número de alelos por loco; He – heterozigosidade esperada; Ho – heterozigosidade observada; f – coeficiente de endocruzamento (significativo para todos os locos seguidos de *: $p < 0.0071$, valor nominal ajustado); Q – probabilidade de exclusão de paternidade; QC – probabilidade combinada de exclusão de paternidade; I – probabilidade de identidade genética; IC – probabilidade combinada de identidade genética.

Tabela 05 – Desequilíbrio de ligação entre os pares de locos para *T. ochracea*.

Pares de locos	Valores de p^*
Tau 07 x Tau 12	0,398
Tau 07 x Tau 15	0,003
Tau 07 x Tau 17	0,003
Tau 07 x Tau 28	0,003
Tau 07 x Tau 30	0,773
Tau 07 x Tau 31	0,707
Tau 12 x Tau 15	0,003
Tau 12 x Tau 17	0,003
Tau 12 x Tau 28	0,003
Tau 12 x Tau 30	0,954
Tau 12 x Tau 31	0,938
Tau 15 x Tau 17	0,007
Tau 15 x Tau 28	0,003
Tau 15 x Tau 30	0,348
Tau 15 x Tau 31	0,003
Tau 17 x Tau 28	0,003
Tau 17 x Tau 30	0,674
Tau 17 x Tau 31	0,005
Tau 28 x Tau 30	0,245
Tau 28 x Tau 31	0,003
Tau 30 x Tau 31	0,993

*- todos os valores de p foram significativos, $p=0,0024$.

4.1.1 Análise da Genotipagem – Evidências de alelo nulo, “stutter” e “dropout” de alelos

A análise realizada no programa Micro-Checker conclui que os locos Tau 07, Tau 12, Tau 15 e Tau 31 apresentam evidências de alelos nulos. Estes mesmos locos apresentaram evidências de erro de genotipagem devido à presença de “stutters”. Não foram encontradas evidências de “dropout” de alelos em nenhum dos locos analisados.

Análises comparativas utilizando os locos Tau 12 e Tau 31 indicaram alterações significativas nos resultados de estrutura genética das populações em relação às análises realizadas sem estes locos, apresentando valores maiores de f

para cada população. Isto se deve ao fato destes locos desviarem do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Com exceção dos locos Tau 12 e Tau 31, os demais foram utilizados nas análises de estrutura populacional. Os locos selecionados apresentaram probabilidade combinada de exclusão de paternidade igual a 0,800 e probabilidade combinada de identidade genética igual a $6,6456 \times 10^{-15}$.

4.2 Barreira Geográfica

O número médio de alelos por população foi de 4,6 (Tabela 06). A heterozigidade esperada nas populações de *T. ochracea* apresentou um valor médio igual a 0,416 (Tabela 06). A heterozigidade observada nas populações apresentou um valor médio igual a 0,408 (Tabela 06). Não foi observada diferença significativa entre os valores de heterozigidade esperada e heterozigidade observada para as populações de *T. ochracea*, o que resultou em valores de f não significativos em todas as populações (Tabela 06).

Tabela 06 – Características genéticas das três populações de *T. ochracea* baseadas em cinco locos microssatélites.

População	N	\bar{A}	H_e	H_o	f^*
PELC	70	4,8	0,452	0,469	-0,037
PEMS 1	112	5,0	0,333	0,304	0,086
PEMS 2	30	4,0	0,463	0,452	0,025
Média	70,6	4,6	0,416	0,408	0,025

N -número de indivíduos na população; \bar{A} -número médio de alelos por população; H_e -heterozigidade esperada; H_o -heterozigidade observada; f^* - coeficiente de endocruzamento; $p = 0,003$, não significativo para todos os valores.

A estimativa média do coeficiente de endogamia total (F) não foi significativa (Tabela 07). Os valores de θ foram próximos de zero, variando de 0,003 (Tau 30) a 0,058 (Tau15) (Tabela 07). O valor de θ (0,028) foi significativo, indicando uma diferenciação genética entre as populações, contudo, esta diferenciação é muito pequena (Tabela 07). Os valores de R_{ST} foram menores do que os valores de θ , variando entre $-0,006$ (Tau 30) e $0,034$ (Tau 15), com exceção do loco Tau 17 em que os valores de θ e R_{ST} foram iguais (0,024) (Tabela 07).

Tabela 07 – Estrutura genética de três populações de *T. ochracea* baseada na análise de variância das frequências alélicas e no tamanho dos alelos para cinco locos microssatélites.

Loco	f	F	θ	R_{ST}
Tau 07	0,117	0,164*	0,053*	0,022*
Tau 15	0,005	0,063	0,058*	0,034*
Tau 17	-0,000	0,024	0,024	0,024
Tau 28	0,317*	0,326*	0,013	-0,002
Tau 30	-0,062	-0,059	0,003	-0,006
Para todos locos	0,025	0,053	0,028*	0,014*

f – coeficiente de endocruzamento, $p = 0,003$; F – coeficiente de endocruzamento total, $p = 0,003$; θ – índice de fixação, $p = 0,003$; R_{ST} – diferenciação genética populacional baseada no tamanho dos alelos. Valores significativos seguidos de *.

Os valores de θ entre os pares de populações foram significativos para todas populações, entretanto, a diferenciação entre as populações é muito baixa (Tabela 08).

Tabela 08 – Valores de θ par a par para três populações de *T. ochracea* baseada na análise de cinco locos microssatélites.

	PEMS 1	PEMS 2
PELC	0,02*	0,01*
PEMS 1		0,05*

* $p = 0,016$, significativo para todos valores seguidos de *.

O resultado da análise de estruturação populacional realizada no Structure 2.2 mostra que a formação de apenas um grupo de indivíduos ($K=1$) é mais provável ($\ln = -1417,6$). Esse grupo é formado, portanto, por todos indivíduos das três populações de *T. ochracea*, não havendo separação de grupos por populações.

A partir das medidas de divergência genética entre as populações foi possível inferir sobre o fluxo de genes entre as mesmas. O fluxo gênico foi medido assumindo-se o modelo de ilhas, onde pequenas populações trocam genes aleatoriamente entre si, independente de sua posição geográfica.

A estimativa do fluxo gênico para o par de populações foi alta (>1) em todos os casos (Tabela 09), indicando haver fluxo de genes entre essas populações.

Tabela 09– Estimativas de fluxo gênico entre as populações de *T. ochracea*.

Populações	θ^*	Nm
PELC e PEMS 1	0,025*	4,87
PELC e PEMS 2	0,016*	7,68
PEMS 1 e PEMS 2	0,050*	2,37

* $p = 0,016$, significativo para todos valores seguidos de *.

Na análise de parentesco foi possível observar que a população PELC possui uma maior quantidade de indivíduos com grau de parentesco igual aos meio-irmãos ($r = 0,25$) e primos ($r = 0,125$). A população PEMS 1 apresentou uma maior quantidade de indivíduos com grau de parentesco igual aos primos ($r = 0,125$) e a população PEMS 2, por sua vez, apresentou uma maior quantidade de indivíduos com grau de parentesco igual aos irmãos germanos ($r = 0,5$). Em todas populações, porém, a porcentagem de indivíduos não-relacionados foi maior (Figura 09).

Além disso, foi verificado que indivíduos pertencentes a populações de uma mesma margem do rio São Francisco não são mais relacionados geneticamente do que indivíduos pertencentes a populações de margens opostas. Ao contrário do esperado, o coeficiente de parentesco foi maior entre indivíduos localizados em margens opostas do que entre os indivíduos localizados na mesma margem do rio ($F = 98,6$, $p < 0.001$) (Figura 10). Ou seja, o rio São Francisco não atua como barreira de fluxo gênico entre indivíduos de *T. ochracea*.

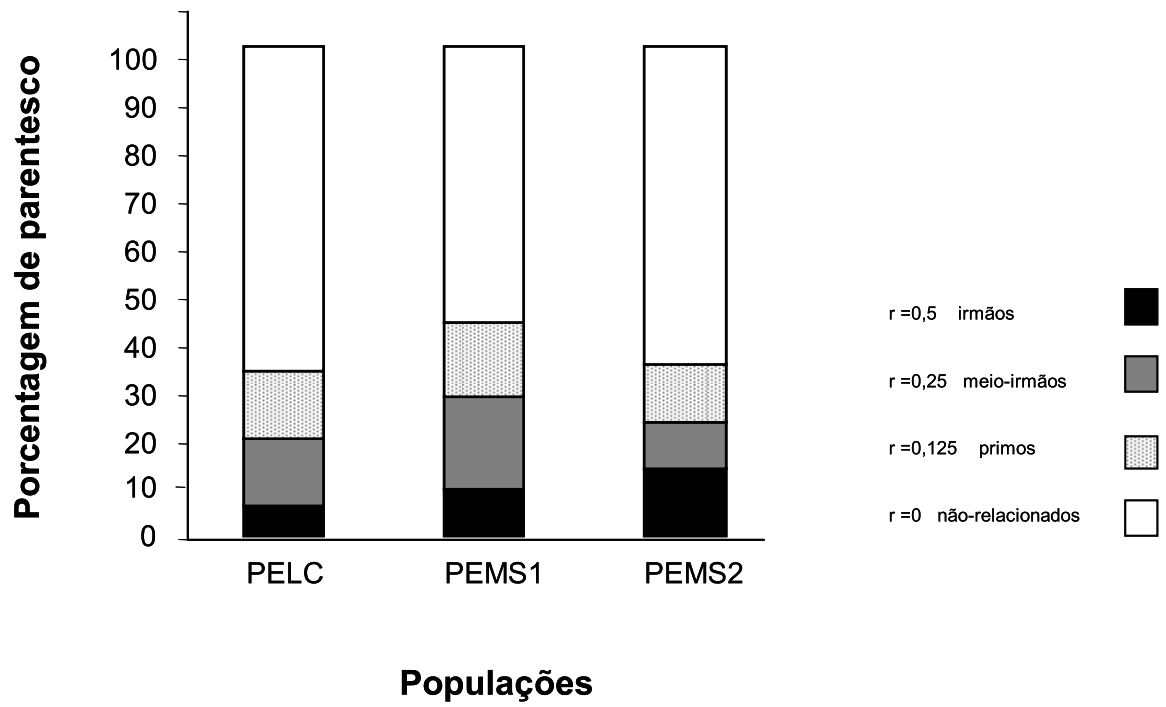


Figura 09- Relação genética entre indivíduos dentro das três populações de *T. ochracea*.

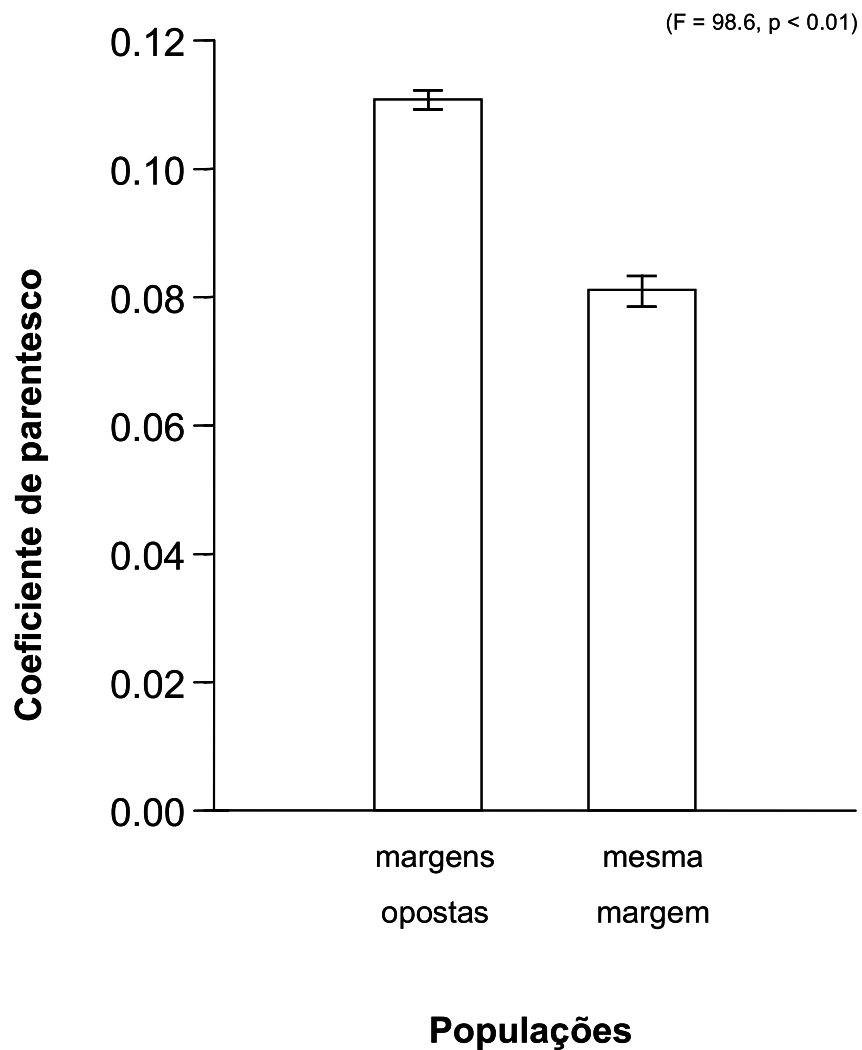


Figura 10- Coeficiente de parentesco médio (\pm EP) entre indivíduos de *T. ochracea* pertencentes às populações localizadas em margens distintas do rio São Francisco e populações localizadas na mesma margem.

4.3 Alteração do Habitat

O número médio de alelos por população foi de 4,6 (Tabela 10). A heterozigosidade esperada nas populações de *T. ochracea* apresentou um valor médio igual a 0,353 (Tabela 10). A heterozigosidade observada nas populações apresentou um valor médio igual a 0,335 (Tabela 10).

Não foi observada diferença significativa entre os valores de heterozigidade esperada e heterozigidade observada para as populações de *T. ochracea*, o que resultou em valores de f não significativos nas duas populações (Tabela 10).

Tabela 10 – Características genéticas das populações de *T. ochracea* baseadas em cinco locos microssatélites.

População	N	\hat{A}	He	Ho	f^*
PEMS 1	112	5,0	0,333	0,304	0,086
PEMS 3	89	4,2	0,372	0,365	0,016
Média	100,5	4,6	0,353	0,335	0,051

N -número de indivíduos na população; \hat{A} -número médio de alelos por população; He -heterozigidade esperada; Ho -heterozigidade observada; * f -coeficiente de endocruzamento; $p = 0,005$, não significativo para todos valores.

A estimativa média do coeficiente de endogamia total (F) não foi significativa (Tabela 11). Os valores de θ foram próximos de zero, variando de -0,006 (Tau 17) a 0,074 (Tau 07) (Tabela 11). O valor de θ (0,015) indica uma significativa diferenciação genética entre as duas populações, contudo, esta diferenciação é muito pequena (Tabela 11). Os valores de R_{ST} variaram entre -0,006 (Tau 17 e Tau 28) e 0,125 (Tau 07) (Tabela 11). O loco Tau 07 apresentou valor R_{ST} maior que θ , já os demais locos apresentaram valores de R_{ST} menores que θ , com exceção do loco Tau 17, que apresentou o mesmo valor para os dois índices (Tabela 11).

Tabela 11 – Estrutura genética das populações de *T. ochracea* baseada na análise de variância das frequências alélicas e no tamanho dos alelos para cinco locos microssatélites.

Loco	f	F	θ	R_{ST}
Tau 07	-0,050	0,027	0,074	0,125
Tau 15	-0,018	-0,011	0,007	-0,002
Tau 17	0,345	0,341	-0,006	-0,006
Tau 28	0,536	0,535	-0,003	-0,006
Tau 30	-0,144	-0,147	-0,003	-0,004
Para todos locos	0,048	0,062	0,015	0,023

f – coeficiente de endocruzamento, $p = 0,005$; F – coeficiente de endocruzamento total, $p = 0,005$; θ – índice de fixação, $p = 0,005$; R_{ST} – diferenciação genética populacional baseada no tamanho dos alelos. Valores significativos seguidos de *.

O valor de θ entre o par de população foi significativo, porém, baixo ($\theta = 0,015$; $p = 0,05$).

O resultado da análise de estruturação populacional realizada no Structure 2.2 mostra que a formação de apenas um grupo de indivíduos ($K=1$) é mais provável ($\ln L = -1205,2$). Esse grupo é formado, portanto, pelos indivíduos das duas populações de *T. ochracea*.

A análise de gargalo genético foi realizada baseando-se em 70% das mutações para o modelo SMM e 30 % para o modelo TPM. Na análise em que se assumiu as populações PEMS 1 e PEMS 3, não foi detectado evento de gargalo genético. Todos os locos se ajustam ao modelo TPM, as duas populações se encontram em equilíbrio mutação-deriva e não há evidência de redução drástica recente no tamanho populacional.

A análise de parentesco revelou que as populações PEMS 1 e PEMS 3 possuem porcentagens semelhantes de indivíduos com grau de parentesco igual aos irmãos germanos ($r = 0,5$), meio-irmãos ($r = 0,25$) e primos ($r = 0,125$) e que a porcentagem de indivíduos com grau de parentesco igual a meio-irmãos é maior em ambas populações. A porcentagem de indivíduos não-relacionados ($r \leq 0$) também foi semelhante para ambas populações (Figura 11). Além disso, foi verificado que indivíduos pertencentes a população PEMS 3, formada após modificações do habitat, não são mais relacionados geneticamente do que indivíduos pertencentes a uma população sem alterações antrópicas ($F = 1,19$, $p = 0,27$) (Figura 12). Ou seja, não foi verificado o efeito de alteração do habitat no coeficiente de parentesco em indivíduos localizados em uma população formada após alterações do habitat.

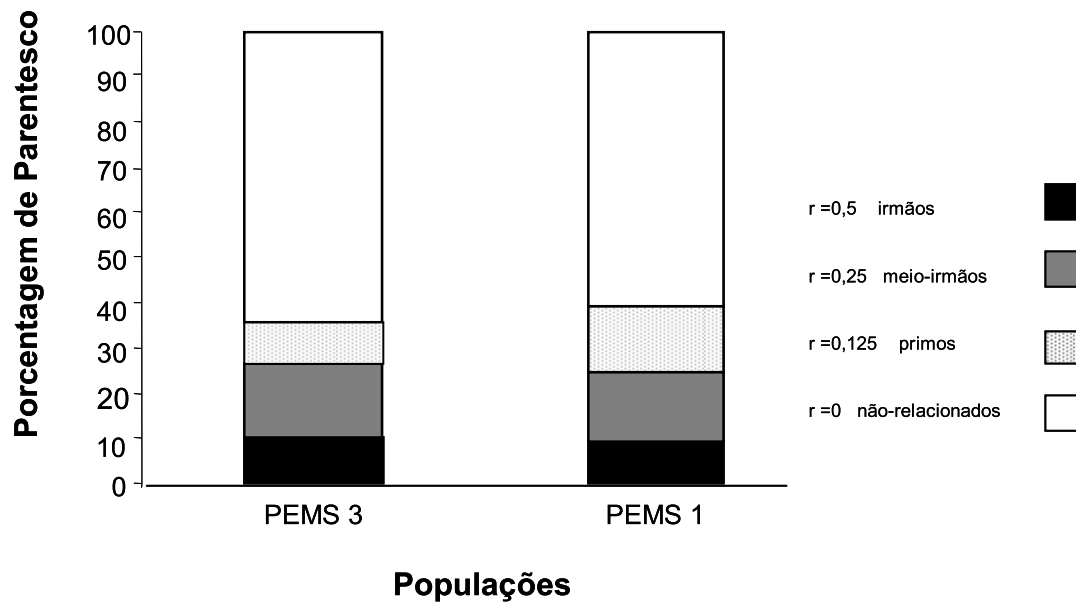


Figura 11- Relação genética de indivíduos dentro e entre duas populações de *T. ochracea*.

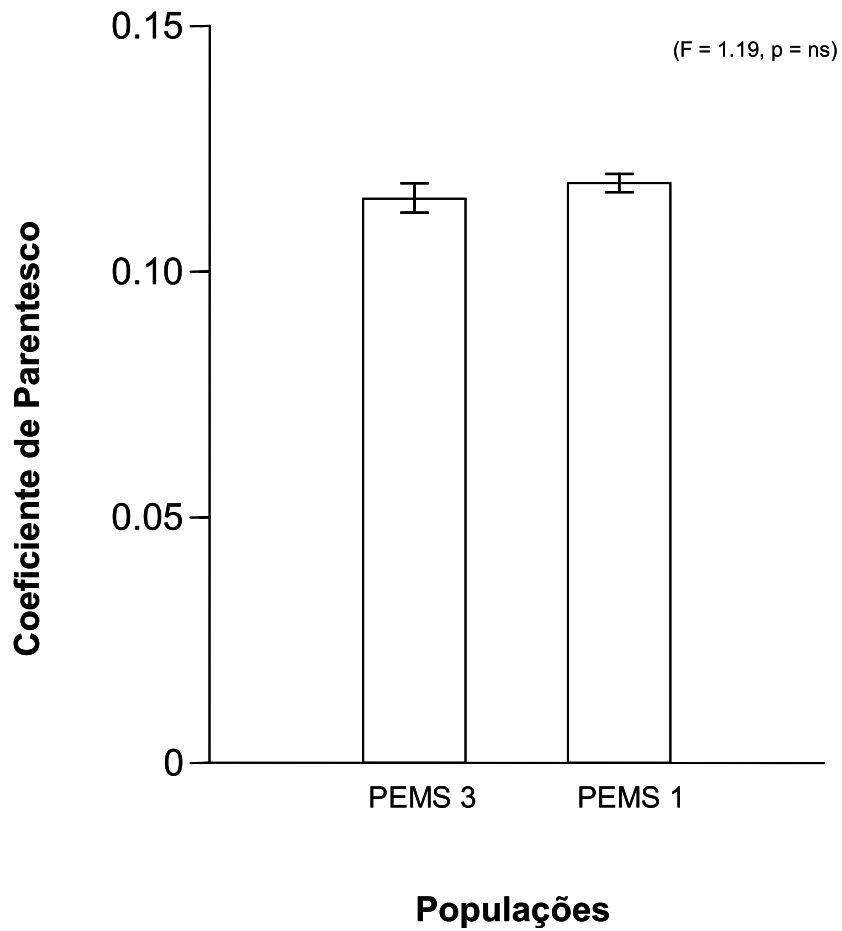


Figura 12- Coeficiente de parentesco médio (\pm EP) entre indivíduos de *T. ochracea* pertencentes a uma população conservada (PEMS 1) e a uma população alterada (PEMS 3).

5. Discussão

5.1 Caracterização dos locos microssatélites

O recurso da transferibilidade de marcadores moleculares microssatélites representa uma grande vantagem tendo em vista o alto custo para o desenvolvimento desses marcadores. Iniciadores heterólogos têm sido utilizados em estudos com espécies arbóreas tropicais (Alves et al., 2006; Ciampi et al., 2008; Zucchi et al., 2002).

Para os cinco *primers* utilizados neste trabalho, o número médio de alelos por loco (6,4) está abaixo do valor observado em estudos realizados com microssatélites em espécies arbóreas tropicais como *Caryocar brasiliense* (23,7; Collevatti et al., 2001a), *Dinizia excelsa* (18,2; Dick et al., 2003), *Eugenia dysenterica* (10,43, Zucchi et al., 2003), *Euterpe edulis* (10,6; Gaiotto et al., 2001), *Shorea leprosula* e *S. ovalis ssp. sericea* (respectivamente, 11,4 e 9,3; NG et al., 2004), *Tabebuia aurea* (18,7; Braga et al., 2007), e *Astronium urundeuva* (10,1, Caetano et al., 2005), uma espécie de matas secas. Entretanto, o valor encontrado no presente estudo é similar ao valor encontrado em *Silene tatarica* (de quatro a nove alelos por locos) em um estudo realizado com cinco locos (Tero & Schlötterer, 2005). Apesar disto, estes marcadores microssatélites representam uma ferramenta útil nestes estudos, pois apresentam um maior número de alelos do que o número encontrado com uso de isoenzimas em *Tabebuia cassinoides*, por exemplo. Nesta espécie foi observado um número médio de alelos por loco igual a 2,64 e 2,5, (Cavallari-Neto, 2004; Sebbenn et al., 2000). Além disso, a probabilidade combinada de identidade genética do conjunto de locos utilizados no presente trabalho foi baixa, o que representa uma baixa possibilidade de serem amostrados dois indivíduos com mesmo genótipo, o que novamente mostra a utilidade desses marcadores em estudos de estrutura genética e parentesco. A probabilidade combinada de exclusão de paternidade, por sua vez, indica que estes marcadores permitem trabalhos de parentesco em populações naturais.

A heterozigosidade esperada (0,458) para estes cinco locos foi menor do que em *Caryocar brasiliense* (0,840; Collevatti et al., 2001a), *Dinizia excelsa* (0,728; Dick et al., 2003), *Eugenia dysenterica* (0,587, Zucchi et al., 2003), *Euterpe edulis* (0,75;

Gaiotto et al., 2003), *Shorea leprosula* e *S. ovalis ssp. sericea* (respectivamente, 0,700 e 0,570; NG et al., 2004), *Tabebuia aurea* (0,890; Braga et al., 2007), *Astronium urundeuva* (0,632, Caetano et al., 2005), mas está acima do valor encontrado para *Silene tatarica* (0,191; Tero & Schlötterer, 2005). Entretanto, novamente é observado que estes marcadores microssatélites representam uma ferramenta útil nestes estudos, apresentando um valor de heterozigosidade esperada maior do que o observado em *Tabebuia cassinoides* (0,491; Sebbenn et al., 2000; 0,314; Cavallari-Neto, 2004), utilizando-se isoenzimas.

Durante a caracterização dos locos microssatélites foi observado que a população de Águas Emendadas acrescentou uma maior quantidade de alelos (dados não apresentados). Este resultado mostra que essa população possui alelos que não estão presentes nos indivíduos pertencentes às populações de matas secas.

O uso de marcadores heterólogos em *T. ochracea* é fundamental na geração de dados necessários para estudos de conservação e manejo desta espécie.

5.1.1 Análise da Genotipagem – Evidências de alelo nulo, “stutter” e “dropout” de alelos

Dos locos utilizados, Tau 07 e Tau 15, apresentaram evidências de “alelos nulos” devido ao excesso de homozigotos observados em relação ao esperado. Estes mesmos locos apresentaram evidências de erro de genotipagem devido à presença de “stutters”. Embora haja evidência da presença de “stutters” nos locos Tau 07 e Tau 15 as análises dos eletroferogramas confirmaram que os heterozigotos que diferiram por apenas dois pares de base são efetivamente heterozigotos, apresentando padrões de picos esperados para tais. Além disso, estes locos não afetaram os resultados de estrutura genética como ocorrido para os locos Tau 12 e Tau 31, e, por isso, os locos Tau 07 e Tau 15 foram utilizados nas análises.

5.2 Barreira Geográfica

As populações de *T. ochracea* estudadas para este teste apresentaram níveis de polimorfismo e valores de heterozigosidade baixos. Esta espécie é caracterizada, portanto, por baixa diversidade genética nas áreas de matas secas do norte do

estado de Minas Gerais. A baixa diversidade genética é característica de efeito fundador (Frankham et al., 2002) e o que pode explicar a ocorrência da baixa diversidade desta espécie nas matas secas seria a colonização deste local por poucos indivíduos durante o período seco do Pleistoceno. Durante o final deste período houve uma expansão das matas secas (Pennington et al., 2000), que originou o Arco-pleistocênico (Prado & Gibbs, 1993), e a expansão desta espécie pode ter sido promovida por poucos indivíduos, advindos do Cerrado, o que explicaria a baixa diversidade genética encontrada, inclusive a menor quantidade de alelos encontrada em relação à população de Águas Emendadas, área de domínio do Cerrado.

A heterozigosidade observada foi menor que a heterozigosidade esperada nas populações. Entretanto, essa diferença não foi significativa, o que proporcionou valores de coeficiente de endogamia não significativos, indicando que o acasalamento entre os indivíduos nas mesmas é aleatório e não há excesso de indivíduos homozigotos nas populações estudadas. A estimativa média do coeficiente de endogamia total foi não foi significativa, mostrando que não existe endogamia entre o conjunto de populações.

A análise de estrutura genética das populações de *T. ochracea* mostrou que há uma diferenciação significativa entre as três populações estudadas ($\theta=0,028$). Contudo, esta diferenciação é muito baixa. Segundo Frankham e colaboradores (2002) um valor de diferenciação acima de 0,15 é considerado indicador de significativa diferenciação entre populações. Além disso, não foi encontrada significativa quantidade de endogamia quando as freqüências alélicas foram analisadas em todos locos. Embora θ possa subestimar a diferenciação, o fato de R_{ST} ter sido menor que θ ($R_{ST} = 0,014$) mostra que não há divergência entre identidade por descendência e por estado nos locos utilizados.

A diferenciação genética par a par mostrou valores significativos de diferenciação entre todas as populações. Todavia, o valor de diferenciação foi muito baixo em todos os casos. Estes resultados indicam que não há uma diferenciação genética efetiva entre as populações.

O fluxo gênico aparente estimado apresenta valores altos entre as populações. Govindajaru (1989) faz uma distinção de três níveis de fluxo gênico: alto, quando $Nm > 1$, intermediário, quando $0,25 < Nm < 0,99$, e baixo, quando

$Nm < 0,25$. De acordo com esta definição, o fluxo gênico encontrado entre essas populações é alto. Altos níveis de fluxo gênico diminuem a perda de diversidade genética e mantêm a viabilidade das populações em longo prazo (White et al., 1999; Wright, 1943). Os resultados de fluxo gênico corroboram a ausência de diferenciação genética entre os indivíduos de *T. ochracea*. Existe, portanto, um fluxo gênico entre as populações que mantêm a homogeneidade entre elas, impedindo a diferenciação das mesmas. Foi observada ainda uma maior taxa de fluxo gênico entre indivíduos pertencentes a populações de margens opostas do rio São Francisco, se comparada a populações localizadas na mesma margem. Esses resultados, bem como, observado na análise Bayesiana mostram que o rio não atua como barreira geográfica ao fluxo gênico entre populações de *T. ochracea* e enfatiza ainda a ausência de estruturação genética, afirmando que todos indivíduos pertencem a um mesmo pool gênico.

A análise de parentesco revela que indivíduos pertencentes a populações de uma mesma margem do rio São Francisco não são mais relacionados geneticamente do que indivíduos pertencentes a populações de margens opostas. Este resultado mostra novamente que o rio não atua como barreira geográfica ao fluxo gênico.

O fato do rio São Francisco não atuar como barreira geográfica ao fluxo gênico entre as populações analisadas, bem como, a ausência de diferenciação genética entre essas populações, está associado ao fluxo gênico existente entre os indivíduos de *T. ochracea* em diferentes populações promovido pela polinização e dispersão de suas sementes.

O isolamento reprodutivo de plantas está associado ao comportamento de seus polinizadores e dispersores (Ghazoul, 2005). O fluxo gênico em árvores pode ocorrer devido à dispersão do pólen e da semente (Nason et al., 1997). O fluxo gênico entre populações separadas fisicamente pode ocorrer se os polinizadores são capazes de percorrer longas distâncias (Ghazoul, 2005). A espécie *T. ochracea* é polinizada por abelhas dos gêneros *Centris* e *Bombus* (Barros, 2001), que são abelhas de grande porte que podem forragear por longas distâncias. Estudos com espécies de abelhas do gênero *Bombus* revelam que essas abelhas podem alcançar até 9,8 Km (Goulson & Stout, 2001) e 12 Km de vôo (Hedtke, 1996). A maior distância já registrada de vôos de Hymenoptera foi feita por Janzen (1971), que observou vôos de *Euglossa imperialis*, uma abelha polinizadora de plantas tropicais,

a 23 Km de distância. Nason e colaboradores (1998) verificaram que vespas (Agaonidae, Chalcidoidea), também da ordem Hymenoptera, polinizadoras de figos (*Ficus* sp., Moraceae) transferiram pólen entre árvores separadas por até 10 Km em uma floresta tropical. Dessa forma, as abelhas polinizadoras de *T. ochracea* podem migrar entre as populações para forragear e, com isso, promover a troca de genes entre os indivíduos, mesmo entre aqueles separados pelo rio São Francisco.

Além disso, a espécie *T. ochracea* tem suas sementes dispersas pelo vento (Lorenzi, 1992), suas sementes possuem adaptações morfológicas para tal, são aladas, pequenas, leves e produzidas em grande quantidade (Lorenzi, 1992; Silva Junior, 2005). Esses fatores facilitam a dispersão de suas sementes pelo vento e podem atingir longas distâncias (van der Pijl, 1982). Segundo Nathan e colaboradores (2002) sementes dispersas pelo vento podem atingir, pelo menos, algumas centenas de metros e até mesmo dezenas de quilômetros. Müller (1955) registrou a distância alcançada por algumas sementes dispersas pelo vento: em *Abies* 7 Km, *Pinis sylvestris* 2 Km, *Betula*, 1,6 Km, *Acer* 4 Km, *Fraxinus excelsior* 0,5 Km. Em *Tussilago* a distância registrada de suas sementes foi de 14 Km, *Populus* 30 Km e em *Senecio congestus* 200 Km (van der Pijl, 1982). Ademais, Ghazoul (2005) observou que sementes dispersas pelo vento são imunes a descontinuidades na paisagem. Assim, as sementes de *T. ochracea* podem atravessar o rio São Francisco colonizando as margens opostas do mesmo e mantendo um fluxo gênico entre os indivíduos de margens opostas.

Pinto e colaboradores (2004) verificaram que o rio Capivari é uma barreira geográfica ao fluxo gênico entre populações de *Copaifera langsdorffii*, fazendo com que populações localizadas em margens opostas sejam geneticamente diferenciadas. *C. langsdorffii* é uma árvore polinizada por abelhas de pequeno porte, tais como *Apis mellifera*, *Scatotrigna depilis* e *Trigona spinipes* (Freitas & Oliveira, 2002) que podem não conseguir atravessar o rio. Além disso, suas sementes são dispersas por aves, *Ramphastos toco*, *Cyanocorax cristatellus* e *Turdus rufiventris* (Carvalho, 1994). Estudos demonstram que rios podem de fato restringir o movimento de algumas espécies de aves (Capparella, 1988, 1991), evidenciando que as mesmas podem não atravessar o rio. Este mesmo resultado foi observado em *Silene tatarica* (Tero et al., 2003), a qual é polinizada por abelhas e suas sementes são dispersas principalmente por gravidade (Tero, 2005). Resultado semelhante ao observado neste estudo com *T. ochracea* foi encontrado em *Primula*

sieboldii (Kitamoto et al., 2005), espécie também polinizada por abelhas do gênero *Bombus* que possui sementes dispersas por gravidade (Fumiko et al., 2005).

O fato dos indivíduos de *T. ochracea* entre as populações PELC e PEMS 2 apresentarem maior taxa de fluxo gênico pode ter contribuído para os resultados encontrados de maior parentesco entre indivíduos de margens opostas do rio São Francisco. Esses resultados podem estar associados ainda ao *status* de conservação das áreas. A população PEMS 1, por exemplo, está localizada em uma área que não possui registros de perturbações antrópicas. Essa população provavelmente possui uma maior quantidade de recursos atrativos para seus polinizadores, como a maior densidade de árvores (ver Madeira, 2008), o que faz com que os indivíduos polinizadores permaneçam no local para forragear. As populações PELC e PEMS 2 estão localizadas em áreas em que sofreram perturbações antrópicas e, por isso, estão localizadas em ambientes em que o recurso para os polinizadores provavelmente é mais escasso, como uma menor densidade de árvores. Este fato pode provocar uma maior movimentação dos polinizadores em busca de recursos para forrageamento.

5.3 Alteração do Habitat

As populações de *T. ochracea* estudadas para este teste apresentaram níveis de polimorfismo e valores de heterozigosidade baixos. Novamente, essa espécie é caracterizada por baixa diversidade genética nas matas secas do norte do Estado de Minas Gerais e, como visto, pode estar associado ao efeito fundador.

A heterozigosidade observada foi menor que a heterozigosidade esperada nas populações. Entretanto, essa diferença não foi significativa, o que proporcionou valores de coeficiente de endogamia não significativos, indicando que não há excesso de indivíduos homozigotos nas populações estudadas.

Embora R_{ST} ($R_{ST} = 0,023$) tenha apresentado maior diferenciação genética entre as populações do que θ ($\theta = 0,015$), e ambas serem significativas, essas estimativas indicam baixa diferenciação entre as populações. A diferenciação genética entre as populações apresentou também um valor significativo, porém, baixo ($\theta = 0,05$). Estes resultados, bem como o resultado da análise Bayesiana, mostram que não existe uma estruturação genética entre essas populações.

A análise de gargalo genético, baseada no modelo de mutação SMM e na proporção de 70% deste último e 30% do modelo TPM, mostrou que as populações se encontram em equilíbrio entre mutação-deriva. Assim, não há evidências de que as populações em questão tenham sofrido efeito de gargalo genético. Como não foi observada estruturação genética entre as populações e a análise do Bayesiana revelou que esses indivíduos pertencem a um mesmo pool gênico, foi realizado um teste de gargalo genético com todos indivíduos pertencendo a uma mesma população. Porém, não foi observado gargalo genético também nessas condições, o que mostra que apesar da baixa diversidade genética, essas populações não sofreram reduções drásticas no seu tamanho populacional. Este resultado corrobora a hipótese de que as populações de *T. ochracea* nas matas secas dessa região tenham sido formadas por poucos indivíduos promovendo o efeito fundador.

A análise de parentesco revela uma porcentagem semelhante de indivíduos relacionados entre e dentre essas duas populações. A porcentagem de indivíduos não relacionados também é semelhante para ambas populações. Além disso, foi verificado que os indivíduos da população PEMS 3, formada após o uso da área como pastagem, não apresentam maior grau de parentesco entre eles. Este resultado mostra que a alteração do habitat não promoveu a formação de uma população com indivíduos similares geneticamente. Isto pode ser devido ao fato de a população PEMS 3 ser formada por progênies de diferentes indivíduos da população PEMS 1, ou ainda, ser formada por progênies de populações não estudadas no presente trabalho.

Os efeitos de alterações do habitat, portanto, nas populações de *T. ochracea* não foram detectados, ou ainda, são inexistentes. Isto provavelmente se deve ao fato de que a perturbação nas matas secas é um evento relativamente recente, quando comparado ao tempo de geração do ipê, ou que a alteração do habitat realmente não altera o fluxo gênico entre populações de *T. ochracea*, pois, como visto anteriormente, existe fluxo entre populações isoladas. Como visto, a espécie *T. ochracea* tem suas sementes dispersas pelo vento, possuindo adaptações morfológicas para tal evento (Lorenzi, 1992; Silva Junior, 2005), podendo atingir longas distâncias (van der Pijl, 1982). As sementes assim dispersas podem atingir quilômetros de distância (Nathan et al., 2002; Muller, 1955; van der Pijl, 1982). Sendo assim, as sementes de *T. ochracea* de populações vizinhas, como PEMS 1, podem chegar até a população PEMS 3, promovendo a colonização desta área e

mantendo um fluxo gênico de sementes para este local. É válido reforçar que o fluxo gênico neste caso ocorre apenas pela chegada de sementes à população PEMS 3, pois esta é formada apenas por indivíduos juvenis que ainda não atingiram estágio de reprodução, não produzindo, portanto, pólen e nem sementes.

Segundo Ghazoul (2005) o processo de dispersão de sementes por aves e mamíferos é susceptível a alterações do habitat enquanto que o processo de dispersão de sementes pelo vento não é modificado com alterações do habitat. Na verdade, a dispersão de pequenas sementes pelo vento é favorecida em habitats alterados por ações antrópicas se comparada a dispersão de grandes sementes por animais (Tabarelli & Peres, 2002). Charles-Dominique (1986) e Foster e colaboradores (1986) observaram que sementes dispersas por aves e mamíferos possuem declínios mais abruptos em sua movimentação ao longo de um habitat alterado (floresta-pasto) em relação as sementes dispersas por vento ou por morcegos. Fore e colaboradores (1992) afirmam que a dispersão de sementes pelo vento pode, na verdade, ser favorecida pela alteração do habitat. Segundo Whitlock & McCauley (1990) sementes dispersas pelo vento ainda apresentam a vantagem de não serem distribuídas em forma de “grupos de sementes relacionadas geneticamente”. Animais dispersores de sementes, como aves e mamíferos, dispersam sementes em longas distâncias, mas geralmente, são sementes advindas de um único indivíduo, ou de poucos, o que promove a dispersão de sementes similares geneticamente, podendo favorecer a formação de grupos relacionados e contribuindo para a diferenciação de populações (Whitlock & McCauley, 1990).

Apsit e colaboradores (2001) não encontraram evidências de que a alteração de habitat nas matas secas em Guanacaste, Costa Rica, afeta o fluxo gênico em *Enterolobium cyclocarpum*. Ao contrário, ocorre fluxo gênico entre os indivíduos e as árvores recebem pólen de indivíduos distantes. Os autores afirmam que este fato pode ser devido a floração da espécie que ocorre durante a estação seca, em que os recursos são escassos e a disponibilidade de flores da espécie poderia promover o fluxo gênico graças a atração de seus polinizadores (abelhas, mariposas e besouros) pelo recurso floral. Um estudo realizado com *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 2001a), também não detectou efeitos da fragmentação na estrutura genética de *C. brasiliense*. Os autores sugerem que os eventos de fragmentação ocorridos no Cerrado são recentes e por isso suas conseqüências na estrutura genéticas desta espécie ainda não foram detectadas. Em *Ceiba aesculifolia*

(Herrerías-Diego et al., 2006) não foi detectado efeito negativo em seu sucesso reprodutivo e em *Delphinium nuttallianum* (Schulke & Waser, 2001) foi detectado movimento de seus agentes polinizadores (abelhas do gênero *Bombus*) entre em populações isoladas, revelando que as populações atuam como populações panmíticas em termos de troca de pólen.

Provavelmente, os indivíduos de *T. ochracea* da população PEMS 3 são formados por progênies de populações vizinhas, como a população PEMS 1 (distantes a 4 Km) e outras não estudadas neste trabalho. Dessa forma, com o fim do processo de formação de pastagem na área (ver Madeira, 2008), as sementes que chegaram no local obtiveram as condições ideais para recolonização da área.

6. Conclusões

- 1 - A utilização de marcadores microssatélites desenvolvidos para *Tabebuia aurea* e transferidos para *Tabebuia ochracea* proporciona novas perspectivas na geração de dados importantes na conservação e manejo desta espécie.
- 2 - As populações de *T. ochracea* estudadas apresentam baixa diversidade genética, mas apesar disso não apresentam eventos de endogamia.
- 3 - A análise de estruturação genética entre as populações revela que existe fluxo gênico entre as mesmas e, conseqüentemente, baixa diferenciação entre elas.
- 4 - O rio São Francisco não atua como barreira geográfica ao fluxo gênico entre populações de *T. ochracea* localizadas em margens opostas.
- 5- Os efeitos da alteração das matas secas por modificações antrópicas sobre a estrutura genética e fluxo gênico de *T. ochracea* não foram detectados, ou ainda, são inexistentes.

7. Referências Bibliográficas

Aldrich, P.R.; Hamrick, J.L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. *Science*, v.281, p.103-105, 1998.

Alves, R.M.; Sebbenn, A.M.; Artero, A.S.; Figueira, A. Microsatellite loci transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. *Molecular Ecology Notes*, v.6, p.1219-1221, 2006.

Anaya, F.; Barbosa, R.; Sampaio, C. Sociedade e biodiversidade na Mata Seca Mineira. *Unimontes Científica*, v.8, n.1, p.35-41, 2006.

Andersen, L.W.; Fog, K.; Damgaard, C. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.271, p.1293-1302, 2004.

Antunes, F.Z. Caracterização climática do Estado de Minas Gerais: climatologia agrícola. *Informe Agropecuário*, v.12, p.9-13, 1986.

Apsit, V.J.; Hamrick, J.L.; Nason, J.D. Breeding population size of a fragmented population of a Costa Rican dry forest tree species. *The Journal of Heredity*, v.92, p.415-420, 2001.

Avise, J.C.; Haig, S.M.; Ryder, O.A.; Lynch, M.; Geyer, C.J. Descriptive genetic studies: applications in population management and conservation biology. In: *Population management for survival and recovery*. Ballou, J.D.; Fose, T.J. (Eds.) New York: Columbia University Press, p.183-244, 1995.

Bacles, C.F.E.; Lowe, A.J.; Ennos, R.A. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. *Science*, v.311, p.628, 2006.

Barros, M.G. Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. and *T. ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae) in Central Brazil cerrado vegetation. *Revista Brasileira de Botânica*, v.24, n.3, p.255-261, 2001.

Beckmann, J.S.; Weber, J.L. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, v.12, p.627–631, 1992.

Bending, M.M.; Hentschel, C.C. Transcription of sea urchin histone genes in HeLa cells. *Nucleic Acids Research*, v.11, p.2337-2346, 1983.

Braga, A.C.; Reis, A.M.M.; Leoi, L.T.; Pereira, R.W.; Collevatti, R.G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology Notes*, v.7, n.1, p.53-56, 2007.

Caetano, S.; Prado, D.; Pennington, R.T.; Beck, S.; Oliveira-Filho, A.; Spichiger, R.; Naciri, Y. The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology*, v.17, p.3147-3159, 2008.

Caetano, S.; Silveira, P.; Spichiger, R.; Naciri-Graven, Y. Identification of microsatellite markers in a neotropical seasonally dry forest tree, *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology Notes*, v.5, p.21-23, 2005.

Capparella, A. Genetic variation in neotropical birds: implications for the speciation process. *Acta Congressus Internatinalis Ornithologici*, v.19, p.1658-1664, 1988.

Capparrella, A. Neotropical avian diversity and riverine barriers. *Acta Congressus Internatinalis Ornithologici*, v.20, p.307-316, 1991.

Carvalho, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. EMBRAPA-CNPQ, Brasília, 1994, 640 p.

Cascante, A.; Quesada, M.; Lobo, J.J.; Fuchs, E.A. Effects of dry tropical Forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, v.16, p.137-147, 2002.

Cavallari-Neto, M. Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* LAM (DC), por marcadores isoenzimáticos. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Chakravarat, I.; Li, C.C. The effect of linkage on paternity calculations. In: Inclusion probabilities in parentage testing. Walkera, R.H. (ed). Arlington: American Association of Blood Banks, p.411-420, 1983.

Charles-Dominique, P. Inter-relations between frugivorous vertebrates and pioneer plants: *Cecropia*, birds and bats in French Guyana. In: Frugivores and seed dispersal. Estrada, A.; Fleming, T.H. (eds). Dr.W.Junk, Dordrecht, Holanda, p.119-136, 1986.

Ciampi, A.Y.; Azevedo, V.C.R.; Gaiotto, F.A.; Ramos, A.C.S.; Lovato, M.B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. Molecular Ecology Notes, Artigo publicado *on-line*: Maio, 2008.

Ciamp, A.Y.; Brondani, R.P.V.; Grattapaglia, D. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* (Copaíba)–Leguminosae-Caesalpinioideae e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco. Boletim de Pesquisa Embrapa, v.16, p.1-40, 2000.

Cockerham, C.C. Variance of gene frequencies. Evolution, v.23, p.72-84, 1969.

Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. Molecular Ecology, v.10, p.349-356, 2001a.

Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. Heredity, v.86, p.60-67, 2001b.

Collevatti, R.G.; Leite, K.C.E.; Miranda, G.H.B.; Rodrigues, F.H.G. Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* (Myrmecophagidae), from Emas National Park, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, n.1, p.112-120, 2007.

Cornuet, J.M.; Luikart, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequencies data. *Genetics*, v.144, p.2001-2014, 1996.

Costa, M.E.; Sampaio, D.S.; Paoli, A.A.S.; Leite, S.C.A.L. Poliembrião e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, n.2, p.395-406, 2004.

Crawley, M. J. *Statistical Computing: an Introduction to Data Analysis Using S-Plus*, Chichester, John Wiley & Sons, 2002, 761 p.

Crow, J.F.; Aoki, K. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.81, p.6073-6077, 1984.

Crow, J.F.; Kimura, M. *An introduction to population genetics*. New York, Harper and Row, 1970. 591p.

Dick, C.W.; Abdul-Salim, K.; Bermingham, E. Molecular systematics reveals cryptic tertiary diversification of a widespread tropical rainforest tree. *American Naturalist*, v.162, p.691–703. 2003.

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

Di Rienzo, A.; Peterson, A.C.; Garza, J.C.; Valdes, A.M.; Slatkin, M.; Freimer, N.B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , v.91, p.3166-3170, 1994.

Dixon, J.D.; Oli, M.K.; Wooten, M.C.; Eason, T.H.; McCown, J.W.; Cunningham, M.W. Genetic consequences of habitat fragmentation and loss: the case of the Florida black bear (*Ursus americanus floridanus*). *Conservation Genetics*, v.8, p.455-464, 2007.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.1, p.13-15, 1987.

Edwards, A.; Civitello, A.; Hammond, H.A.; Caskey, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *The American Journal of Human Genetics* , v.49, p.746-756, 1991.

Ellstrand, N.C.; Elam, D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.24, p.217-242, 1993.

Espírito-Santo, M.M.; Fagundes, M.; Nunes, Y.R.F.; Fernandes, G.W.; Sánchez-Azofeifa, G.A.; Quesada, M. Bases para conservação e uso sustentável das florestas estacionais decíduas brasileiras: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Unimontes Científica*, v.8, n.1, p.13-22, 2006.

Estoup, A.; Cornuet, J. M. Microsatellites evolution: inferences from population data. In: *Microsatellites: evolution and applications*, Goldstein, D.B.; Schlotteröer, C. (eds.) Oxford University Press, New York, 1999, pp. 49-66.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, 3 ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

Fore, S.A.; Hickey, R.J.; Vankat, J.L.; Guttman, S.I.; Schaefer, R.L. Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. *Canadian Journal of Botany*, v.70, p.1659-1668, 1986.

Foster, R.B.; Arce, J.; Wachter, T.S. Dispersal and the sequential plant communities in Amazonian Peru floodplain. In: Frugivores and seed dispersal. Estrada, A.; Fleming, T.H. (eds). Dr.W.Junk, Dordrecht, Holanda, p.357-370, 1986.

Frankham, R. Conservation Genetics. Annual Review of Genetics, v.29, p.305-327, 1995.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. Conservation Genetics. Cambridge University Press: Cambridge UK, 2002. 617p.

Franklin, I.R. Evolutionary changes in small populations. In: Conservation Biology, an evolutionary-ecological perspective, Soulé ME, Wilcox BA (eds). Sunderlands, Sinauer Associates, Inc. pp. 135-149, 1980.

Freitas, C.V.; Oliveira, P.E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). Revista Brasileira de Botânica, v.25, p.311-321, 2002.

Fuchs, E.J.; Lobo, J.J.; Quesada, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. Conservation Biology, v.17, p.149-157, 2003.

Fumiko, I.; Ueno, S.; Tsumura, Y.; Washitani, I. Fine-scale genetic structures in an endangered perennial *Primula sieboldii* under different site conditions. The Ecological Society of America, 90th Annual Meeting, August, Montreal, Canadá, 2005.

Funk, W.C.; Blouin, M.S.; Corn, P.S.; Maxell, B.A.; Pilliod, D.S.; Amish, S.; Allendorf, F.W. Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. Molecular Ecology, v.14, p. 483–496, 2005.

Gaiotto, F.A.; Brondani, R.P.V.; Grattapaglia, D. Microsatellite markers for heart of palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). Molecular Ecology Notes, v.1, p.86-88, 2001.

Gaiotto, F.A.; Grattapaglia, D.; Vencovsky, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity*, v.94, p. 399-406, 2003.

Gascon, C.; Loughheed, S.C.; Bogart, J.P. Genetic and morphological variation in *Vanzolinius discodactylus*: a test of the river hypothesis of speciation. *Biotropica*, v.28. p.376-387, 1996.

Gascon, C.; Malcolm, J.R.; Patton, J.L.; da Silva, M.N.F.; Bogart, J.P.; Loughheed, C.; Peres, C.A.; Neckel, S.; Boag, P.T. From the cover: riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v.97, p.13672-13677, 2000.

Gentry, A.H. An overview of neotropical phytogeographic patterns with an emphasis on Amazonia. *Anais do Simpósio do Trópico Úmido*, v.2, 1986, p.19-35.

Gentry, A.H. Evolutionary patterns in neotropical Bignoniaceae. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, v.55, p.118-129, 1990.

Gentry, A.H. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica*, v.6, 64-68, 1974.

Ghazoul, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biological Reviews*, v.80, p. 413–443, 2005.

Gibbs, P.E.; Bianchi, M. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. *Botanica Acta*, v.106, p.64-71, 1993.

Gilpin, M.E.; Soulé, M.E. Minimum viable populations: process of species extinction. In: *Conservation Biology, The Science of Scarcity and Diversity* Soulé, M. E. (ed.). Sinauer Associates, Sunderland, MA. p. 19-34, 1986.

Gomes, L.J.; Gomes, M.A.O. Extrativismo e biodiversidade: o caso da fava d'anta. *Ciência Hoje*, v.27, p.66-69, 2000.

Gonçalves, A.C. Estrutura genética em populações naturais de *Dimorphandra mollis* Benth. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Goodman, S.J. R_{ST} Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology*, v.6, p.881-885, 1997.

Gordos, K.; Kenchington, E.L.; Hamilton, L.C.; Nakashima, B.S.; Taggart, C.T. Atlantic capelin (*Mallotus villosus*) tetranucleotide microsatellites. *Molecular Ecology Notes*, v.5, p.220-222, 2005.

Goudet, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>, 2002.

Goudet, J.; Raymond, M; de-Meeus, T; Rousset, F. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, v.144, p.1933-1940, 1996.

Goulson, D.; Stout, J.C. Homing ability of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, v.32, p.105-111, 2001.

Govindajaru, R.D. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *Journal of Evolutionary Biology*, v.2, p.173-181, 1989.

Hamada, H.; Petrino, M.G.; Kakunaga, T. A novel repetitive element with Z-DNA-forming potential is widely found in diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.79, p.6465-6469, 1982.

Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W.; Sherman-Broyles, S.L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, v.6, p.95-124, 1992.

Hamrick, J.L.; Murawski, D.A. The breeding structure of tropical tree populations. *Plant Species Biology*, v.5, p.157-165, 1990.

Harding, R.M.; Boyce, A.J.; Clegg, J.B. The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*, v.131, p.847-859, 1992.

Hauge, X.Y.L.; Litt, M. A study of the origin of "shadow bands" seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Human Molecular Genetics*, v.2, p.411-415, 1993.

Hedtke, C. Untersuchungen zur Heimfindeleistung von *Bombus* (Hymenoptera, Apidae): Eine Analyse der leistungsbeeinflussenden Faktoren. Schriftenreihe des Länder-instituts für Bienenkunde Hohen Neuendorf 2, Berlin.

Herrerías-Diego, Y.; Quesada, M.; Stoner, K.; Lobo, J.A. Effects of forest fragmentation on phenological patterns and reproductive success of the tropical dry forest tree *Ceiba aesculifolia*. *Conservation Biology*, v.20, p.1111-1120, 2006.

Honnay, O.; Jacquemyn, H. Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology*, v.21, p.823-831, 2007.

Huber, O. Neotropical savannas: their flora and vegetation. *Trends in Ecology and Evolution*, v.2, p. 67, 1987.

IEF–Instituto Estadual de Florestas. Áreas Protegidas: Parque Estadual Lagoa do Cajueiro. Disponível

em: http://www.ief.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=203&Itemid=37. Acessado em: 18 jun. 2007.

IEF-Instituto Estadual de Florestas. Parecer técnico para a criação do Parque Estadual da Mata Seca. Relatório técnico, Belo Horizonte-MG. 2000.

Janzen, D.H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, v.171, p.203-205, 1971.

Janzen, D.H. Management of habitat fragments in a tropical dry forest: Growth. *Annals Missouri Botany Garden*, v.75, p.105-116, 1988.

Jeffreys, A.J.; Tamaki, K.; MacLeod, A.; Monckton, D.G.; Neil, D. L.; Armour, J.A.L. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics*, v.6, p.136-145, 1994.

Jones, F.A.; Hubbell, S.P. Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical tree *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology Notes*, v.3, p.403-405, 2003.

Jordan, L.; Baldi, A.; Orci, K.M.; Racz, I.; Varga, Z. Characterizing the importance of habitat patches and corridors in maintaining the landscape connectivity of a *Pholidoptera transsylvanica* (Orthoptera) metapopulation. *Landscape Ecology*, v.18, p.83-92, 2003.

Katti, M.V.; Ranjekar, P.K.; Gupta, V.S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v.18, p.1161–1167, 2001.

Kantety, R.V.; La Rota, M.; Matthews, D.E.; Sorrells, M.E. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, v.48, p.501–510, 2002.

Keller, I.; Largiadèr, C.R.; Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of variability in ground beetles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.270, p.417-423, 2003.

Kimura, M.; Crow, J. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, v.49, p.725-738, 1964.

Kimura, M.; Ohta, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v.75, p.2868-2872, 1978.

Kitamoto, N.; Honjo, M.; Ueno, S.; Takenaka, A.; Tsumura, Y.; Washitani, I.; Ohsawa, R. Spatial genetic structure among and within populations of *Primula sieboldii* growing beside separate streams. *Molecular Ecology*, v.14, p.149-157, 2005.

Lambrot, M; Eaton, L.; Carrasco, B.A. The Aconcagua river as another barrier to *Liolaemus monticola* (Sauria: Iguanidae) chromosomal races of central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, v.76, p.23-34, 2003.

Lemes, M.R.; Grattapaglia, D.; Grogan, J.; Proctor, J.; Gribel, R. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened neotropical tree species. *Plant Ecology*, v.192, p.169-179, 2007.

Levinson, G.; Gutman, G.A. Slipped-Strand Mismatching: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p.203-221. 1987.

Lewis, P.O.; Zaykin, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data, version 1.0. Disponible em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. 2001.

Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p.2453–2465, 2002.

Litt, M.; Luty, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics* , v.44, p.397-401, 1989.

Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992. 352p.

Lougheed, S.C.; Gascon, C.; Jones, D.A.; Bogart, J.P.; Boag, P.T. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.266, p.1829-1835, 1999.

Loveless, M.D.; Hamrick, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.15, p.65-95, 1984.

Madeira, B.G. Diversidade de borboletas frugívoras no norte de Minas Gerais. 2008. 135 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Manel, S.; Schwartz, M.K.; Luikart, G.; Taberlet, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, v.18, n.4, p.189-197, 2003.

Mayle, F.E. The late quaternary biogeographical history of South American seasonally dry tropical forests; insights from paleo-ecological data. In: *Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation*, Pennington R.T.; Lewis, G.P.; Ratter, J.A. (eds). Taylor & Francis, London. 2006, pp 395-416.

Menges, E.S. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. *Conservation Biology*, v.5, p.158-164, 1991.

Miles, L.; Newton, A.C.; DeFries, R.S.; Ravillious, C.; May, I.; Blyth, S., Kapos, V. Gordon, J.E. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography*, v.33, p. 491-505, 2006.

Morgante, M.; Hanafey, M.; Powell, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, v. 30, p.194–200, 2002.

Morgante, M.; Olivieri, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, v.3, p.175-182, 1993.

Müller, v.P. Verbreitungsbiologie der Blütenpflanzen, 2ed, Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes Rübel in Zürich, St. Rübel, 1955. 152 p.

Murcia, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, v.10, n.2, p.58-62, 1995.

Murphy, P.G.; Lugo, A.E. Structure and biomass of a subtropical dry forest in Puerto Rico. *Biotropica*, v.18, n.2, p.89-96, 1986.

Naciri, Y.; Caetano, S.; Pennington, R.T.; Prado, D.; Spichiger, R. Population genetics and inference of ecosystem history: an example using two neotropical seasonally dry forest species. In: *Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation*, Pennington R.T.; Lewis, G.P.; Ratter, J.A. (eds). Taylor & Francis, London. 2006, pp 417-432.

Nason, J.D.; Hamrick, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. *Journal of Heredity*, v.88, p.264-276, 1997.

Nason, J.D., Herre, E.A.; Hamrick, J.L. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature*, v. 391, p.685–687, 1998.

Nathan, R.; Katul, G.G.; Horn, H.S.; Thomas, S.M.; Oren, R.; Avissar, R.; Pacala, S.W.; Levin, S.A. Mechanisms of long-distance dispersal of seeds by wind. *Nature*, v.418, p.409-413, 2002.

NG, K.K.S.; Lee, S.L.; Koh, C.L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. *Molecular Ecology*, v.13, p.657-669, 2004.

O'Brien, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , v.91, p. 5748-5755, 1994.

Oliveira, D.A.; Moreira, P.A.; Melo Júnior, A.F.; Pimenta, M.A.S. Potencial da biodiversidade vegetal da região Norte do Estado de Minas Gerais. Unimontes Científica, v.8, n.1, p.23-33, 2006.

Oliveira-Filho, A.T. Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais: mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais. Editora UFLA, Lavras, MG. 2006, 423 p.

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Molecular Ecology, v.4, p.347-354, 1995.

Pandey, M.; Gailing, O.; Fischer, D.; Hattemer, H.H.; Finkeldey, R. Characterization of microsatellite markers in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). Molecular Ecology Notes, v. 4, n.2, p.253-255, 2004.

Pennington R.T.; Lewis, G.P.; Ratter, J.A. An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of neotropical savannas and seasonally dry forests. In: Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation, Pennington R.T.; Lewis, G.P.; Ratter, J.A. (eds). Taylor & Francis, London. 2006, pp 1-30.

Pennington, R.T.; Prado, D.E.; Pendry, C.A. Neotropical seasonally dry forests and quaternary vegetation changes. Journal of Biogeography, v.27, p. 261–273, 2000.

Pinto, S.I.C.; Souza, A.M.; Carvalho, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populaces de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. Scientia Florestalis, n.65, p.40-48, 2004.

Piry, S.; Luikart, G.; Cornuet, J.M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, v.90, p.502-503, 1999.

Pott, A.; Pott, V.J. *Plantas do Pantanal*. Brasília: Embrapa, 1994. 320 p.

Powell, W.; Machray, G.C.; Provan, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends of Plant Science*, v.1, p.215-222, 1996.

Prado, D.E.; Gibbs, P.E. Patterns of species distributions in the dry forest South America. *Annals Missouri Botany Garden*, v.80, p.902-927, 1993.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945-959, 2000.

Queiroz, L.P. The Brazilian Caatinga: phytogeographical patterns inferred from distribution data of Leguminosae. In: *Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation*, Penington R.T.; Lewis, G.P.; Ratter, J.A. (eds). Taylor & Francis, London. 2006, pp 121-158.

Queller, D.C.; Goodnight, K.F. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, v.43, p.258-275, 1989.

Quesada, M.; Stoner, K.E.; Lobo, J.A.; Herrerías-Diego, Y. Effects of forest fragmentation on pollinator activity and consequences for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated Bombacaceous Trees. *Biotropica*, v.36, p.131-138, 2004.

R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL Disponível em: <http://www.R-project.org>. 2006.

Ribeiro, S.P.; Pimenta, H.R.; Fernandes, G.W. Herbivory by chewing and sucking insects on *Tabebuia ochracea*. *Biotropica*, v.26, n.3, p.302-307, 1994.

Ribeiro, J.F.; Walter, B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Cerrado ambiente e flora, Sano, S.M. & Almeida, S.P. (eds). Editora Embrapa, Planaltina, DF. 1998, pp. 89-168.

Ricklefs, R.E. O desenvolvimento da comunidade. In: A economia da natureza
Ricklefs, R.E. (ed). Rio de Janeiro, RJ. Editora Guanabara Koogan S.A. 2003. 501p.

Ritland, K. MARK - Marker inferred relatedness and quantitative inheritance program.
Vancouver: University of British Columbia. Disponível em:
<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>. 2004.

Rizzini, C.T. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica do Brasil. Revista Brasileira de Geografia, v.25, n.1, p.3-64, 1963.

Sánchez-Azofeifa, G.A.; Kalacska, M.; Quesada, M.; Calvo-Alvarado, J.C.; Nassar, J.M.; Rodríguez, J.P. Need for integrated research for a sustainable future in tropical dry forests. Conservation Biology, v.19, n.2, p.285-286, 2005.

Santos, R.M.; Vieira, F.A.; Fagundes, M.; Nunes, Y.R.F.; Gusmão, E. Riqueza e similaridade florística de oito remanescentes florestais no norte de Minas Gerais, Brasil. Revista Árvore v.31, n.1, p.135-144, 2007.

Schlotteröer, C.; Amos, B.; Tautz, D. Conservation of polymorphic simple sequences loci in cetacean species. Nature, v.354, p.63, 1991.

Schug, M.D.; Wetterstrand, K.A.; Gaudette, M.S.; Lim, R.H.; Hutter, C.M.; Aquadro, C.F.

The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. Molecular Ecology, v.7, p.57-70, 1998.

Schulke, B.; Waser, N.M. Long-distance pollinator flights and pollen dispersal between populations of *Delphinium nuttallianum*. Oecologia, v.127, p.239-245, 2001.

Sebbenn, A.M.; Seoane, C.E.S.; Kageyama, P.Y.; Vencovsky, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). *Scientia Florestalis*, n.58, p.127-143, 2000.

Senner, J. Inbreeding depression and the survival of zoo populations. In: *Conservation Biology*, Soulé, M.; Wilcox, B. (eds.). Sinauer Associate Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 151-169, 1980.

Silva, J.M.C.; Tabarelli, M.; Fonseca, M.T.; Lins, L.V. (orgs.). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2004.

Silva Junior, M.C. *100 árvores do Cerrado: guia de campo*. Brasília: Ed. Rede de Sementes do Cerrado, 2005. 278 p.

Slatkin, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v. 139, p.457-462, 1995.

Smith, G.P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, v.191, p.528-535, 1976.

Spear, S.F.; Peterson, C.R.; Matocq, M.D.; Storfer, A. Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology*, v.14, p.2553-2564, 2005.

Sullivan, J.J. How the sapling specialist shoot-borer, *Cromarcha stroudagnesia* (Lepidoptera, Pyralidae, Chrysauginae), alters the population dynamics of the Costa Rican dry forest tree *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae). 2000. 202 p. Tese (Doutorado) - University of Pennsylvania, Pennsylvania, USA.

Tabarelli, M.; Peres, C.A. Abiotic and vertebrate seed dispersal in the Brazilian Atlantic forest : implications for forest regeneration. *Biological Conservation*, v.106, p.165–176, 2002

Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v.17, p.6463-6471, 1989.

Tautz, D.; Trick, M. Dover, G.A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, v.322, p.652-656, 1986.

Tero, N. Genetic structure at different spatial scales in metapopulations of *Silene tatarica*. 2005. 41 p. Dissertação (Mestrado) - University of Oulu, Oulu, Finlândia.

Tero, N.; Aspi, J.; Siikamäki, P.; Jäkäläniemi, A.; Tuomi, J. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Molecular Ecology*, v.12, p.2073-2085, 2003.

Tero, N.; Schlötterer, C. Isolation and characterization microsatellite loci from *Silene tatarica*. *Molecular ecology Notes*, v.5, p.517-518, 2005

Thode, A.B.; Maltbie, M.; Hansen, L.A.; Green, L.D.; Longmire, J.L. Microsatellite markers for the Mexican spotted owl (*Strix occidentalis lucida*). *Molecular Ecology Notes*, v.2, p.446-448, 2002.

Tóth, G.; Gáspári, Z.; Jurka, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, v.10, p.967–981, 2000.

Tomimatsu, H.; Ohara, M. Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camschatcense* (Trilliaceae). *Biological Conservation*, v.109, p.249-258, 2003.

Townsend, C.; Begon, M.; Harper, J.L. *Fundamento em ecologia*; Tradução Gilson Rudinei Pires Moreira ... [et al.]. – 2. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2006. 592 p.

Turner, I. M.; Corlett, R.T. The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. *Trends in Ecology and Evolution.*, v. 11. n.8, p.330-333, 1996.

Udupa, S.M.; Baum, M. High mutation rate and mutational bias at (TAA)_n microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, v.6, p.1097-1103, 2001.

Vallinoto, M.; Araripe, J.; do Rego, P.S.; Tagliaro, C.H.; Sampaio, I.; Schneider, H. Tocantins river as an effective barrier to gene flow in *Saguinus niger* populations. *Genetics and Molecular Biology*, v.29, p.215-219, 2006.

van Belkum, A., S. Scherer, L. van Alphen, and H. Verbrugh. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, p.275–293. 1998.

van der Pijl, L. *Principles of Dispersal in Higher Plants*, 3ed, Springer, Berlin, 1982. 153 p.

van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v.4, p.535-538, 2004.

Wattier, R.; Engel, C.R.; Saumitou-Laprade, P.; Valero, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, v.7, p.1569-1573, 1998.

Weber, J.L. Informativeness of human (dC–dA)_n–(dG–dT)_n polymorphisms. *Genomics*, v.7, p.524–530, 1990.

Weber, J.L.; May, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics*, v.44, p.388-396, 1989.

Weber, J.L.; Wong, C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, v. 2, p. 1123–1128, 1993.

Weir, B.S. Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996, 445 p.

Weir, B.S.; Cockerham, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v.38, p.1358-1370, 1984.

Werneck, H.P.; Rangel Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. Mudanças na florística e estrutura de uma floresta decidual durante um período de quatro anos (1994-1998), na região do Triângulo Mineiro, MG. *Revista Brasileira de Botânica*, v.23, n.4, p.401-413, 2000.

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](#)