UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

JULIANA MASSIMINO FERES

Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação

Ribeirão Preto

2009

JULIANA MASSIMINO FERES

Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética.

Orientadora: Professora Dra. Ana Lilia Alzate Marin.

Ribeirão Preto
2009

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

Feres, Juliana Massimino.

Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de ***Tabebuia roseo-alba*** (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação / Juliana Massimino Feres; orientadora Ana Lilia Alzate Marin.

-- Ribeirão Preto, 2009.

142 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação em Genética. Área de concentração: Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Ipê branco. 2. Marcadores moleculares microssatélites. 3. Fragmentação florestal. Conservação *in situ* e *ex situ.*

Aos meus carinhosos e
companheiros pais Carmem e
Edgar e irmã Mariana, dedico
com muito amor e gratidão todo
o meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Genética do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, bem como todos os docentes e funcionários que o compõe, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Às instituições que apoiaram esse estudo: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Mestrado concedida e apoio financeiro na realização desse trabalho; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) e à Pró Reitoria de Pós Graduação da Universidade de São Paulo.

A prof. Dra. Ana Lilia Alzate Marin, pela orientação, dedicação e confiança depositados em mim no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pela oportunidade, pelas experiências e, acima de tudo, pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais compartilhados nesses anos.

À Faculdade de Engenharia/ Unesp – Campus de Ilha Solteira e ao Prof. Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes pela possibilidade de coleta de material biológico na Fazenda de Ensino e Pesquisa sem o qual esse trabalho não teria sido realizado. Também agradeço aos técnicos Alexandre Marques da Silva e José Cambuim pelo precioso auxílio nas coletas de semente e marcação de árvores na população de Selvíria.

Ao prof. Dr. Alexandre magno Sebbenn que, nos anos de convivência, muito me ensinou e colaborou com o processo de definição e orientação desse trabalho.

Ao prof. Dr. Antônio Moacyr Mestriner pelo auxílio e dedicação na manutenção do laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À Prof. Dra. Rosane G. Collevatti da Universidade Católica de Brasília pelo fornecimento das sequência dos *primers* microssatélites usados nessa pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Genética vegetal Alison Gonçalvez Nazareno, Klaus Accoroni, Marcela Corbo Guidugli, Marcelo Martinez, Matheus da Silva Mayor e Ronai Ferreira Ramos pelo convívio agradável, alem dos conselhos acadêmicos e pessoais que fizeram os dias de trabalhos mais divertidos e felizes. Agradeço em especial à doutoranda Marcela e mestrando Alison pela amizade sincera, companheirismo e auxílio inestimável na rotina laboratorial. É impossível desvincular meu êxito da troca de experiência e dos doces momentos de descontração que passamos juntos dentro e fora do ambiente de trabalho.

Ao amigo, companheiro e ex-colega de laboratório Matheus agradeço com muito amor pela ajuda nas coletas e plantios das sementes, mas, principalmente, pela paciência, carinho e amor dedicados a mim nos bons e maus momentos durante a realização desse trabalho.

Aos meus colegas externos ao meu trabalho, especialmente às minhas companheiras de república Pâmela Costa Adorno da Silva e Fernanda Gamper Vergamine pela confiança, companheirismo e amizade sempre depositados em mim.

Por fim, aos meus pais Carmem e Edgar, à minha irmã Mariana e às minhas avós, Leonor e Geny, pelo amor incondicional dedicado a mim, sem o qual não teria força, coragem e perseverança suficientes para concluir essa etapa tão importante da minha vida. Tudo o que sou e tudo aquilo que eu poderei alcançar é fruto da cumplicidade e apoio da minha família, na qual não tenho palavras para expressar a imensidão do meu amor.

RESUMO

FERES, J.M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação.** 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Tabebuia roseo-alba (Ridl.) Sand. (ipê branco) é uma árvore semidecídua que floresce abundantemente entre os meses de Agosto e Setembro. Valiosa pela qualidade de sua madeira, bem como por sua capacidade de ornamentação, esta espécie tem sido largamente utilizada em reflorestamentos e arborização urbana. A fragmentação florestal reduz o tamanho da população reprodutiva, a densidade populacional e pode isolar populações e indivíduos em campos e pastagens. Dessa forma, entender seus efeitos é fundamental para providenciar recomendações para conservação *in situ* e *ex situ* de espécies florestais. Assim, os objetivos desse trabalho foram: transferir, padronizar e caracterizar marcadores moleculares microssatélites previamente desenvolvidos em *Tabebuia aurea* para *Tabebuia roseo-alba*; avaliar a diversidade e divergência genética, o sistema reprodutivo e o fluxo de pólen em duas populações de *T. roseo-alba* submetidas a diferentes condições de preservação localizadas em área urbana no município de Ribeirão Preto- SP e ambiente natural em Selvíria-MS. Para isso, sementes de polinização aberta derivadas de árvores matrizes procedentes das duas populações em estudo foram coletadas. Todas as amostras tiveram seu DNA extraído e amplificado com oito pares de microssatélites heterólogos. As análises mostraram que todos os locos avaliados apresentaram herança mendeliana simples e segregam independentes, sendo, portanto, adequados para estudos de sistema de cruzamento, estrutura genética de populações e análise de paternidade. Também foi constatado que

as duas populações têm elevada diversidade genética (He variando de 0,743 a 0,835) sendo as amostras de Selvíria mais diversas. Os níveis de divergência genética entre as populações foram altos e com tendência a aumentar quando comparadas as gerações de progênies. A análise do sistema de cruzamento, permitiu afirmar que as populações estudadas são mistas (t_m Ribeirão Preto = 0,840 e t_m Selvíria = 0,963) com maior probabilidade de aumento na autofecundação nas árvores isoladas da população urbana. Significantes desvios do cruzamento aleatório foram observados através do cruzamento entre parentes e cruzamentos correlacionados entre e dentro de frutos, indicando endogamia nas populações. O número efetivo de doadores de pólen foi muito baixo para um mesmo fruto (1,21 em Ribeirão Preto e 1,50 em Selvíria) e mais alto entre frutos de uma mesma árvore (8,20 em Ribeirão Preto e 9,8 em Selvíria). A distância média do fluxo de pólen acessada pela análise TWOGENER foi baixa nas duas populações tanto para o modelo normal (35,4m em Ribeirão Preto e 57,3m em Selvíria) quanto para o exponencial (39,9m em Ribeirão Preto e 64,6m em Selvíria). Como o conhecimento da endogamia, cruzamentos correlacionados, autofecundação e estrutura genética espacial são fatores chave na tomada de decisões para a coleta de sementes e o plantio das mudas, estes resultados podem auxiliar programas de restauração florestal e conservação da espécie.

ABSTRACT

FERES, J.M. **Genetic diversity, mating system and pollen flow in two populations of *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: Implications for conservation.** 2009. 142f. Dissertation (Master of Science) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Tabebuia roseo-alba (Ridl.) Sand (Guayacan blanco) is one semideciduous tree that blossoms massively between August and September. Valuable for the quality of its wood, as well as its ability to ornamentation, this species has been used in urban afforestation and reforestation. The forest fragmentation reduces the size of the reproductive population, population density and can isolate populations and individuals in fields and pastures. Thus, the knowledge of the fragmentation effects may be indispensable for successful tree species conservation, breeding and regeneration. So, the aims of this study were: transfer, standardize and characterize molecular markers microsatellites developed for *Tabebuia aurea*; assess the diversity and genetic divergence, the mating system and the flow of pollen in two populations of *T. roseo-alba* in different preservation conditions in an urban area located in Ribeirao Preto- SP and in a natural environment from Selvíria-MS. Therefore, open-pollinated seeds derived from seed-trees coming from the two populations above were collected. All samples had their DNA extracted and amplified with eight pairs of heterologous microsatellites. The analysis showed that all assessed loci have simple Mendelian inheritance and independent segregation, and are, therefore, suitable for studies of mating system, genetic structure of populations and paternity analysis. It was also noted that the two populations have high genetic diversity (*He* ranging from 0.743 to 0.835) being Selvíria samples more diversified. The levels of genetic divergence among

populations were high and with a tendency to increase when the generations of offspring were compared. The analysis of the mating system showed that the populations have a mixed-mating system (t_m Ribeirão Preto = 0.840 e t_m Selvíria = 0.963) with an increasing of self-fertilization in isolated trees from the urban population. Significant deviations from random mating were observed through of mating among relatives and correlated matings among and within fruits, indicating inbreeding in the populations. The effective number of pollen donors was very low for the same fruit (1.21 in Ribeirão Preto and 1.50 in Selvíria) and higher among fruits of the same tree (8.20 in Ribeirão Preto and 9.8 in Selvíria). The average distance of the pollen flow accessed by TWOGENER analysis was low in the two populations in both normal (35.4 m in Ribeirão Preto and 57.3 m in Selvíria) and exponential models (39.9 m in Ribeirão Preto and 64.6 m in Selvíria). As the knowledge of inbreeding, correlated matings, self-fertilization and spatial genetic structure are key factors to making decisions for the collection of seeds and planting seedlings, these results may help forest restoration programs and conservation of this species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Árvores de ipê utilizadas na arborização urbana. Em A indivíduo de ipê amarelo cujas flores são destacadas em B; em C flores de ipê branco e em D árvore de ipê rosa em uma florada abundante, característica das espécies do gênero. (fotos de Marcelo L.L. Martinez). 13

Figura 2. Fotos ilustrativas de *T. roseo-alba*, destacando (A) folha trifoliolada, (B) diversos estágios do desenvolvimento da flor e (C) fruto verde, sementes e fruto seco de ipê branco. (Arquivo pessoal)..... 16

Figura 3: Árvores de ipê branco floridas presentes no campus da USP/RP (A e B); foto de satélite mostrando a área do campus em que as amostras de ipê branco foram obtidas (C). 27

Figura 4: Foto de parte da floresta da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia/ Unesp (A); Árvore de ipê branco, cujos frutos foram coletados, localizada na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia/ UNESP (B); Foto de satélite mostrando a área de ocorrência da espécie *T. roseo-alba* na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia/ Unesp (C). 28

Figura 5: Fotos de satélite mostrando a posição geográfica das árvores matrizes de *T. roseo- alba* amostradas para o desenvolvimento deste projeto em (A) Selvíra –MS e (B) Ribeirão Preto-SP. 29

Figura 6: Germinação das sementes de ipê branco coletadas em Selvíria- MS. Em A e B pode-se visualizar as bandejas com os tubetes onde as sementes foram plantadas e as placas com a identificação da matriz e fruto; em C observam-se as folhas primárias e o primeiro par de folhas verdadeiras da espécie *T. roseo- alba*. 31

Figura 7: Gel de poliacrilamida 10% contendo amostras de PCR biplex dos primers Tau 21 (amostras superiores no gel) e Tau 22 (amostras inferiores no gel)..... 42

Figura 8. Distribuição das freqüências dos alelos nos oito locos microssatélites analisados nas amostras de *Tabebuia roseo-alba*..... 51

Figura 9. Localização geográfica das áreas de coleta de matrizes de *Tabebuia roseo-alba*: (●) Ribeirão Preto- SP e (▲) Selvíria- MS. 64

Figura 10. Variação na taxa de cruzamento de *Tabebuia roseo-alba* nas populações de Ribeirão Preto e Selvíria. **outliers*- medidas extremas da taxa de cruzamento..... 96

Figura 11. Variação na taxa de correlação de paternidade dentro de frutos em *Tabebuia roseo-alba* nas populações de Ribeirão Preto e Selvíria. **outliers*- medidas extremas de correlação de paternidade. 97

Figura 12. Variação na taxa de correlação de auto-fecundação de *Tabebuia roseo-alba* nas populações de Ribeirão Preto e Selvíria. **outliers*- medidas extremas da taxa de correlação de auto-fecundação. 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos *Primers* SSR testados para a transferibilidade em *T. roseo-alba.* 33

Tabela 2: Condições de PCR para 3 biplex da espécie *T. roseo-alba.* 35

Tabela 3: Tabela contendo os *primers* de ipê branco padronizados usados nesse estudo e a temperatura de anelamento da PCR. 41

Tabela 4: Testes G para hipótese de segregação codominante 1:1 em oito locos SSR de Ipê branco. 44

Tabela 5: Desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de *T. roseo-alba*. Os valores na tabela são as probabilidades após 1000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,000446..... 48

Tabela 6: Diversidade genética, endogamia e poder de exclusão de locos microssatélites em árvores de *Tabebuia roseo-alba*. n é o número de indivíduos analisados; k é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F é o índice de fixação; $\Pr(Ex_1)$ e $\Pr(Ex_2)$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro parente (quando um dos parentes é conhecido) e o segundo parente (quando nenhum dos parentes é conhecido)..... 50

Tabela 7. Probabilidades obtidas com o teste exato de Fisher para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações de *T. roseo-alba.* 53

Tabela 8. Diversidade genética e endogamia de locos microssatélites em árvores adultas e progênies de *Tabebuia roseo-alba*. K é o número total de alelos; R é a riqueza alélica; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; F é o índice de fixação. 66

Tabela 9. Distribuição de alelos privados nas populações de ipê branco de Ribeirão Preto e Selvíria nas gerações de adultos e progênies..... 68

Tabela 10. Parâmetros de diferenciação genética entre as populações de *T. roseo-alba* nas gerações de adultos e progênies. O Hs é a heterozigosidade esperada média entre as populações; Ht é a heterozigosidade esperada total para o conjunto das populações; o FST é a diferenciação genética entre as populações segundo Nei; GST é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick. 69

Tabela 11. Estimativa de parâmetros de endogamia, sistema de reprodução e fluxo gênico em *Tabebuia roseo-alba*. 91

Tabela 12. Estimativa parâmetros de de coancestria, endogamia, sistema de reprodução e fluxo gênico em duas populações de ipê branco..... 92

Tabela 13. Parâmetros da análise Twogener em duas populações de *T. roseo-alba*..... 94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 1

1.1. Biodiversidade e conservação 1

1.2. Biodiversidade e o fluxo de pólen 3

1.3. Situação atual das matas dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul 5

1.3.1. Estado de São Paulo 5

1.3.2. Estado do Mato Grosso do Sul 6

1.4. Importância de estudos de Biodiversidade em paisagens urbanas 7

1.5. Estudos de diversidade genética com auxilio de marcadores moleculares Microssatélites 8

1.6. A espécie de estudo: *Tabebuia roseo-alba* 12

1.6.1. O gênero *Tabebuia* 12

1.6.2. *Tabebuia roseo-alba* 14

2. OBJETIVOS 18

2.1. Objetivo geral 18

2.2. Objetivos específicos 18

3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO 19

Capítulo I 20

RESUMO 21

1. INTRODUÇÃO 22

2. MATERIAL E MÉTODOS 25

2.1. Locais de estudo 25

2.2. Coleta do Material biológico 29

2.3. Coleta, armazenamento dos frutos e plantio das sementes 30

2.4. Extração e quantificação do DNA 32

2.5. Transferibilidade de marcadores microssatélites 33

2.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR) 33

2.7. Ensaios de amplificação multiplex 34

2.8. Eletroforese 35

2.9. Coloração do gel com nitrato de prata e secagem 37

2.10. Determinação fenotípica 37

2.11. Análises estatísticas 38
2.11.1. Análise da herança e de desequilíbrio de ligação dos locos 38
2.11.2. Análise da diversidade genética, equilíbrio de Hardy-Weinberg e endogamia 39

3. RESULTADOS 41

3.1. Transferibilidade de *primers* SSR de *T. aurea* para *T. roseo-alba* 41

3.2. PCRs biplex testadas 41

3.3. Análise da herança 42

3.4. Análise de desequilíbrio de ligação 47

3.5. Análise da diversidade genética, Equilíbrio de Hardy-Weinberg e endogamia 49

4. DISCUSSÃO 54

4.1. Sucessos de transferência dos Marcadores Microssatélites 54

4.2. Análise da herança e de desequilíbrio de ligação 54

4.3. Análise de diversidade, EHW e endogamia 56

5. CONCLUSÕES 58

Capítulo II 59

RESUMO 60

1. INTRODUÇÃO 61

2. MATERIAL E MÉTODOS 63

2.1. Coleta do Material biológico e análise do DNA 63

2.2. Análises estatísticas 64
2.2.1. Análise da diversidade genética e endogamia 64
2.2.2. Estrutura genética entre as populações 65

3. RESULTADOS 66

3.1. Diversidade genética e índice de fixação 66

3.2. Estrutura genética entre as populações 69

4. DISCUSSÃO 71

4.1. Diversidade genética e índice de fixação 71

4.2. Estrutura genética 73

5. CONCLUSÕES 75

Capitulo III **76**

RESUMO **77**

1. INTRODUÇÃO **78**

2. MATERIAL E MÉTODOS **81**

2.1. Coleta das amostras e análise do DNA 81

2.2. Análises estatísticas 82

2.2.1. Sistema reprodutivo 82

2.2.2. Fluxo de pólen – Análise TWOGENER (Two-Generation Analysis) 85

3. RESULTADOS **88**

3.1. Sistema reprodutivo 88

3.2. Fluxo de pólen – Análise TWOGENER 93

4. DISCUSSÃO **95**

4.1. Sistema reprodutivo – taxa de cruzamento e autofecundação 95

4.2. Sistema reprodutivo – taxa de cruzamento entre parentes e endogamia 100

4.3. Sistema reprodutivo - cruzamentos correlacionados 102

4.4. Número efetivo de doadores de pólen 104

4.5. Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo de variância 105

4.6. Análise TWOGENER 106

4.6.1. Diferenciação do *pool* gênico do pólen 106

4.6.2. Distância média de dispersão do pólen 107

4.7. Implicações dos resultados para a conservação da espécie 108

5. CONCLUSÕES **110**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **113**

ANEXOS **113**

ANEXO 1 ..... **132**

ANEXO 2 ..... **141**

ANEXO 3 ..... **142**

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Biodiversidade e conservação

As modificações ambientais decorrentes do processo antrópico de ocupação dos espaços e de urbanização, que vêm acontecendo em escala global, principalmente nos dois últimos séculos, ocorrem em taxas incompatíveis com a capacidade de suporte dos ecossistemas naturais, resultando em esgotamento dos recursos naturais e poluição dos ecossistemas (Philippi & Pelicioni, 2005).

Historicamente, o modo de produção relativo à atividade agrícola brasileira sempre esteve intimamente ligado às atividades predatórias ao meio ambiente, sendo insustentável sob o ponto de vista ambiental. A própria história do Brasil pós-descoberta coincide com os impactos que a expansão da fronteira agrícola vem apresentando sobre áreas ocupadas por florestas, principalmente com relação à Mata Atlântica (Young, 2002).

Este tipo de exploração, aliada ao desconhecimento das exigências culturais, da biologia reprodutiva, da regeneração e do padrão de distribuição genética das diferentes espécies florestais nativas, tem ocasionado deterioração da base genética, comprometendo o patrimônio genético dos ecossistemas (Pinto & Carvalho, 2004).

A fragmentação florestal é um processo de formação de mosaicos de habitats, incluindo fragmentos de diferentes tamanhos, áreas agrícolas e urbanas (Collevatti et al., 2001). Os processos de desmatamento e fragmentação de florestas tropicais têm sido intensos nas últimas décadas. A devastação de florestas tropicais no mundo foi estimada em 9,4 milhões de hectares por ano, dos quais 2,3 milhões correspondem às florestas tropicais úmidas no Brasil (FAO, 2001).

A crescente preocupação mundial com a conservação da biodiversidade é o resultado de um conjunto de valores econômicos, sociais, biológicos, ecológicos,

científicos e estéticos que são proporcionados ao homem pelos recursos genéticos, além de considerações éticas e de responsabilidade com as gerações futuras (Primack & Rodrigues, 2002).

A conservação da natureza é hoje definida em termos de patrimônios genéticos e inclui também espécies não salientes (Frankel & Soule, 1981). Sendo assim, biodiversidade é definida como a diversidade de espécies, ecossistemas e diversidade genética presentes na natureza (Mcneely et al., 1990, *apud* Bittencourt, 2007).

Nas últimas décadas, o foco das pesquisas internacionais tem sido direcionado para o contexto genético da conservação da biodiversidade, pois atualmente as ferramentas científicas permitem quantificar a diversidade genética, os padrões de cruzamento e realizar estudos de dispersão. Tais informações são importantes teoricamente e podem ser aplicadas com o objetivo de responder questões práticas em ecologia (Freeland, 2005).

Nesse sentido, as pesquisas sobre recuperação das áreas degradadas no Brasil, considerando, sobretudo, a conservação e/ou restauração da biodiversidade, associadas aos processos de licenciamento ambiental e o estímulo aos programas de reflorestamento, constitui-se hoje em um dos desafios estabelecidos nos principais programas de políticas públicas das Secretarias de Estado do Meio Ambiente. No Estado de São Paulo, por exemplo, diretrizes norteadoras do processo de repovoamento florestal heterogêneo (ver Resoluções SMA 21, de 21/11/2001; SMA 11, de 25/04/2002; SMA 15, de 04/04/2002 e Portaria conjunta CINP/CPRN, de 11/06/2002) têm sido promovidas visando à conservação de espécies vegetais, especialmente arbóreas de ocorrência regional (Barbosa, 2002).

Os recursos genéticos vegetais só podem ser conservados em sistemas vivos, na forma de plantas, sementes ou tecidos, que devem ser mantidos vivos e com potencial

para reprodução. Vários são os métodos para conservar o germoplasma, os quais são agrupados em duas estratégias distintas: conservação *in situ*, quando as plantas são mantidas em seus habitats naturais, e conservação *ex situ*, quando os recursos genéticos são preservados em bancos de germoplasma, fora do ambiente natural (Primack & Rodrigues, 2002).

Atualmente, a conservação genética *in situ* vem ganhando espaço devido ao reconhecimento da riqueza perdida através da degradação causada pelo homem nas últimas décadas. Esta é a estratégia mais adequada para conservar espécies florestais, já que visa proteger aquelas que apresentam distribuição ecológica restrita, baixa densidade populacional, baixa capacidade de regeneração natural, habitat vulnerável ou ameaçado, silvicultura desconhecida, além daquelas que sofrem um alto índice de exploração (madeira, óleo, alimento, resina e etc) (Primack & Rodrigues, 2002).

1.2. Biodiversidade e o fluxo de pólen

O fluxo de pólen é um dos fatores mais importantes influenciando a estrutura genética de espécies arbóreas. Extensivo fluxo gênico via pólen promove altos níveis de diversidade genética dentro de populações e baixa diferenciação entre populações, sendo o maior mecanismo mantenedor da coesão genética de uma espécie (Dick et al., 2003). Em populações naturais o fluxo gênico intenso pode efetivamente contrapor os efeitos detrimentais da deriva genética ou seleção direcional (Burczyk et al., 2004). Além disso, devido ao fluxo gênico por sementes ser o responsável por dois terços do tamanho da vizinhança genética, o conhecimento de sua extensão também é essencial para estimar o tamanho reprodutivo de populações de espécies arbóreas tropicais (Hamilton, 1999). Resumindo, para predizer as mudanças genéticas causadas pela fragmentação em populações de espécies arbóreas tropicais, é necessário estudar o fluxo

gênico contemporâneo (atual) via sementes e via pólen (Hamilton, 1999) e caracterizar a distribuição genética espacial dentro de vizinhanças reprodutivas.

A determinação da influência do movimento do pólen sobre o tamanho efetivo da população reprodutiva ou tamanho da vizinhança requer detalhada análise da estrutura reprodutiva das populações. Tais análises incluem a identidade do doador de pólen e sua distância da planta materna (Nason et al., 1996). Estudos preliminares baseados na observação do comportamento do vôo dos polinizadores indicavam que o movimento destes ocorria predominantemente entre árvores vizinhas. No entanto, estudos recentes baseados em dados de marcadores genéticos do tipo isoenzimas e microssatélites, em análises estatísticas refinadas como análise de paternidade e análise TWOGENER, têm mostrado que o pólen pode mover-se a distâncias consideráveis entre plantas dentro de populações (Nason et al., 1998; Dick et al., 2003; White et al., 2002).

Em espécies arbóreas, a distribuição espacial, o parentesco intrapopulacional e o sistema de reprodução podem estar associados. Especialmente em espécies arbóreas polinizadas por animais, indivíduos próximos tendem a se cruzar mais do que indivíduos espacialmente distantes. Caso estes indivíduos sejam parentes devido à dispersão de sementes próxima a árvore materna, a endogamia vai aumentar na população com o passar das gerações se a pressão de seleção contra indivíduos endogâmicos não for efetiva (Coles & Fowler, 1976). Para compreender a dinâmica da endogamia entre gerações são necessários estudos em fina escala do sistema de reprodução, distribuição espacial de genótipos e de comparações dos níveis de endogamia existentes em diferentes estágios ontogênicos das plantas.

Portanto, o conhecimento do sistema reprodutivo e os padrões do fluxo gênico dentro dos sistemas tropicais pode ser fundamental para a sobrevivência de espécies

comprometidas, pois pode evitar a perda de variabilidade e ajudar na tomada de decisões conservacionistas.

1.3. Situação atual das matas dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

1.3.1. Estado de São Paulo

O interior do Estado de São Paulo, anteriormente ocupado por matas semidecíduas e cerrados, está praticamente tomado por diferentes culturas ou pastagens, restando apenas algumas pequenas áreas com vegetação de cerrado e Mata Atlântica. De acordo com um recente levantamento do Instituto Florestal de São Paulo, restam apenas 13,9 % da cobertura vegetal natural paulista, o equivalente a 3,46 milhões de hectares (Zorzetto et al., 2003). Como conseqüências verificam-se a exaustão do solo, o assoreamento de cursos d'água e de nascentes e a destruição da biodiversidade que indicam drástica perda do patrimônio genético florestal.

De acordo com o IBGE (1993), a Região de Ribeirão Preto situa-se em uma área de transição entre Floresta Estacional Semidecidual e Cerrado, sendo esta transição na forma de encraves. A formação savânica corresponde ao Cerradão e ocorre em aproximadamente um quarto da área do Município, predominantemente na Região Nordeste. A Floresta Estacional Semidecidual, ou Floresta Mesófila predomina no restante do Município. Entretanto, em decorrência do processo de ocupação populacional, atualmente a vegetação natural encontra-se extremamente fragmentada e cada vez mais exposta às ações antrópicas, que incluem desde a abertura de trilhas, caça e captura de aves, deposição de lixos e entulhos, corte seletivo de árvores e, inclusive, aumento na incidência de fogo (Henriques, 2003).

A supressão da vegetação natural no Município de Ribeirão Preto ocorreu associada a ciclos econômicos. O desmatamento foi insignificante até 1870, quando o

plantio de café começou a substituir a vegetação nativa, principalmente florestas. Entre 1962 e 1984, o aumento da área cultivada com cana-de-açúcar, devido ao programa governamental de incentivo à produção do álcool, provocou diminuição drástica na área de cerrado (Henriques, 2003). Atualmente o município conta apenas com 1,46 % de sua área florestada (Projeto Floresta USP, 2003; SEMA, 1995).

Como conseqüência dessa intensa fragmentação, os remanescentes florestais ou as matas ciliares sofrem impactos causados pela presença da luz, que favorece o crescimento de espécies pioneiras não arbóreas (gramíneas e trepadeiras) e pela ausência de animais polinizadores e dispersores de sementes (Engel et al., 1996).

1.3.2. Estado do Mato Grosso do Sul

Segundo o IBGE (2004), o Estado do Mato Grosso do Sul tem 61% do seu território ocupado pelo Bioma Cerrado. Dos 204 milhões de hectares originais de cerrado, 57% já foram completamente destruídos e a metade das áreas remanescentes estão bastante alteradas, dificultando a conservação da biodiversidade. A taxa anual de desmatamento no bioma é alarmante, chegando a 1,5% (ou 3 milhões de hectares) por ano, estando o Estado do Mato Grosso do Sul entre as regiões onde esta formação está mais ameaçada (International Conservation-Brasil, 2006).

Neste Estado, as atividades agrícolas tiveram grande importância no processo de ocupação do seu território, especialmente a partir das décadas de 60 e 70, quando se constituíram extensas áreas agropecuárias produtivas. Estima-se hoje que existam 23 milhões de hectares ocupados pela atividade agro-pastoril, assim distribuídos: 2 milhões de hectares pela ocupação agrícola, 13 milhões de hectares com pastagens plantadas e 8 milhões de hectares com pastagens naturais (Tierra, 2000).

Nesse sentido, uma área expressiva da vegetação natural do Estado do Mato Grosso do Sul está sendo sistemática e intensivamente reduzida, ou seja, perde-se cada vez mais espaço para a produção agropecuária. Portanto, existe a necessidade de mapear os fragmentos florestais ou matas ciliares nas paisagens intensamente cultivadas, a fim de preservar todo o potencial genético original ainda existente para a conservação *in situ* e/ou *ex situ* da biodiversidade (Rímoli-Odalia et al., 2000).

1.4. Importância de estudos de Biodiversidade em paisagens urbanas

A arborização das cidades surgiu com a intenção de garantir o vínculo do homem com o "natural". A literatura é clara na lista de benefícios decorrentes da arborização urbana: redução de ruídos, modificações do microclima, alteração do campo visual, melhoria do habitat da fauna, recreação, lazer, dentre outros (Philippi & Pelicioni, 2005).

Porém, nos últimos anos, os ecossistemas urbanos têm chamado atenção dos cientistas com relação à potencialidade de estudos conservacionistas nesses ambientes.

Ecossistemas urbanos constituem ambientes fragmentados e podem proporcionar uma boa oportunidade para estudar o impacto da fragmentação nos sistemas ecológicos. Eles podem também ser de particular interesse para análise dos processos evolutivos recentes das espécies de plantas e animais presentes neles (Shocat et al., 2006).

Ambientes urbanos consistem em uma matriz na maioria das vezes imprópria para a manutenção das plantas devido às construções, asfalto, dentre outros fatores. Dentro dessa porção majoritária de ambientes impróprios, pequenas e espaçadas áreas adequadas constituem habitats altamente fragmentados onde plantas podem persistir (Cheptou et al., 2006).

É interessante notar que estudos ecológicos nesses sistemas têm, algumas vezes, reportado maior diversidade de variedades de espécies neles que em sistemas agrícolas, como demonstrado por Wania et al., 2006. Direta e indiretamente, espécies não nativas importantes e uma grande variedade de mecanismos antropogênicos de dispersão de espécies contribuem para a riqueza de espécies nas cidades (Angold et al., 2006).

Por estes motivos, pesquisas recentes colocam a biodiversidade urbana como um ponto importante da conservação (Angold et al., 2006). Diversos estudos chamam atenção para a conservação de elementos da paisagem urbana, até mesmo áreas abandonadas e jardins (Gaston et al., 2005).

O primeiro passo para o manejo de ambientes urbanos é o completo entendimento da interação entre a paisagem (efeitos da matriz) e fatores locais que afetam a biodiversidade. Muitas cidades têm uma rede de habitat ou fragmentos compreendendo áreas verdes urbanas que podem constituir habitats semi-naturais, habitats de sucessão secundária, ambientes pioneiros e áreas abertas. Estes locais podem ter características importantes para a biodiversidade e para a manutenção de habitats (McIntyre et al., 2001), como também podem funcionar como corredores ecológicos para facilitar a dispersão de espécies (Kirby, 1995). No planejamento do ambiente urbano, portanto, a manutenção e implantação de ambientes verdes e de corredores de vida selvagem estão sendo incentivados para promover a preservação e o aumento da biodiversidade nas cidades (Angold et al., 2006).

1.5. Estudos de diversidade genética com auxilio de marcadores moleculares Microssatélites

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos. A

disponibilidade de marcadores morfológicos era essencialmente restrita às poucas espécies de plantas utilizadas como sistemas modelos para o estudo de genética. Com a introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas, ainda na década de 60, iniciou-se a era dos marcadores moleculares. A aplicabilidade da técnica passou a incluir potencialmente todas as espécies de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico do DNA correspondente a regiões expressas ou não. Com os recentes avanços na biologia molecular, surgiram diversas técnicas para detecção de variabilidade genética que acessam diretamente a seqüência de DNA. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Os marcadores moleculares referem-se a diferenças entre indivíduos nas suas seqüências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA e podem ser classificados em função de sua herança, como dominantes e co-dominantes. Em indivíduos diplóides marcadores co-dominantes permitem a distinção de ambos os alelos homólogos de um loco. Já os marcadores dominantes são menos informativos, pois não permitem distinguir o fenótipo heterozigótico do homozigótico (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para verificar a variabilidade genética diretamente no DNA, destacando-se: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites) e microssatélites. Estes marcadores podem diferir com respeito a características importantes como, abundância genômica, nível de

polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro (Buso et al., 2003).

Entre os marcadores moleculares mais adequados para o estudo de estrutura genética e reprodução de populações arbóreas encontram-se os marcadores microssatélites (ou Seqüências Simples Repetidas – SSR) que se tornaram uma ferramenta útil na construção de mapas genéticos, análise de paternidade e fluxo gênico (Chase et al., 1996).

As freqüências dos microssatélites variam significativamente entre os diferentes organismos (Gupta et al., 1996; Weising et al., 1998). O genoma de plantas contém, em média, dez vezes menos microssatélites do que o genoma humano (Gupta & Varshney, 2000).

Os microssatélites formam uma classe de DNA caracterizada por seqüências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em tandem que apresentam uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração (Eisen, 1999). As mutações são causadas por alterações no número das unidades de repetição, sendo que a maioria dessas alterações resulta de mudanças no número integral de cópias das unidades de repetição (Eisen, 1999). Dois modelos podem explicar estas alterações: o *crossing-over* desigual entre as moléculas de DNA, resultado da recombinação entre cromossomos homólogos que não foram alinhados corretamente; e o mecanismo do *slippage* da DNA polimerase. Este último modelo é o mais aceito atualmente e ocorre durante a replicação do DNA e conduz ao aumento ou à diminuição do número de repetições (Tautz & Schlotterer, 1994).

As unidades de repetição dos microssatélites são geralmente mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos. Segundo Oliveira et al. (2006), microssatélites são classificados de acordo com o tipo de seqüência repetida, podendo ser perfeitos (a seqüência repetida

não é interrompida por nenhuma base), imperfeitos (há um par de bases dentro do *motif* de repetição), interrompidos (há uma pequena seqüência de bases dentro da seqüência repetida do microssatélite) e compostos (em que há duas seqüências repetidas distintas adjacentes).

Segundo Eisen (1999), devido à distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem não sofrer ação da seleção natural, o que os torna seletivamente neutros e muito úteis para estudos da genética das populações naturais. Entretanto, atualmente sabe-se que expansão no número de repetições pode causar doenças humanas (como a de Huntington) além de desordens neurodegenerativas (Oliveira et al., 2006). Em plantas, microssatélites têm ocorrido frequentemente dentro e próximo a genes (Morgante et al., 2002).

O potencial dos SSRs como marcadores úteis para plantas foi reconhecido por possuírem uma série de características desejáveis como: distribuição ao acaso e ocorrência em grande quantidade em genomas de eucariotos e procariotos; codominância dos alelos, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados no gel; facilidade de detecção via PCR; alta diversidade alélica (Dayanandan et al., 1997; Chase et al., 1996; Rossetto et al., 1999). Alem disso, são suficientemente estáveis para serem utilizados em análises genéticas e de evolução de populações naturais, especialmente em espécies arbóreas altamente diversas, como já vem sendo demonstrado tanto para espécies tropicais (White & Powell, 1997; Ciampi et al., 2000; Collevatti et al, 1999; Brondani et al, 2003; Zucchi, 2002; Alves, 2002) como temperadas (Steinkellner et al., 1997).

Outra característica muito interessante dos SSRs é sua grande reprodutividade, dado que é possível obter os mesmos resultados em qualquer laboratório do mundo (Cenis, 2005).

Embora os microssatélites tenham se tornado um instrumento popular no mapeamento genético e estudos de fluxo gênico, sua utilidade é limitada devido ao alto custo e tempo para desenvolver *primers* específicos para cada espécie. Uma alternativa para eliminar tempo e despesas envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites para a espécie de interesse tais como, construção de biblioteca genômicas de DNA e sequenciamento de DNA, é a utilização de *primers* heterólogos.

1.6. A espécie de estudo: *Tabebuia roseo-alba*

1.6.1. O gênero *Tabebuia*

O gênero *Tabebuia* pertence à família Bignoniaceae, que é composta por cerca de 110 gêneros e 800 espécies de distribuição predominantemente neotropical (Spangler & Olmstead, 1999). Dentro dessa família o gênero está inserido na tribo Tecomeae, que concentra a maior parte das espécies arbóreas da família Bignoniaceae, com 19 gêneros e 203 espécies nos neotrópicos.

O gênero *Tabebuia* compreende cerca de 100 espécies de árvores e arbustos neotropicais, ocorrendo desde os 28° de latitude norte (Sonora e Chihuahua, México e Ilhas Bahamas) até o norte da Argentina e Uruguai (Gentry, 1992).

Muitas das espécies do gênero *Tabebuia* são nativas do Brasil e vulgarmente denominadas ipê (Lorenzi, 1992). Pertencem ao grupo ecológico das secundárias tardias (Ferretti et al., 1995) e o nome vulgar de cada espécie está relacionado com a coloração das flores, que pode ser branca, amarela, rosa ou roxa (Figura 1). Dentre as espécies nativas do Brasil mais usadas em reflorestamento urbano, *T. roseo-alba* (Ridl.) Sand. é a única que produz flores brancas (Maeda, 1984).

Figura 1. Árvores de ipê utilizadas na arborização urbana. Em *A* indivíduo de ipê amarelo cujas flores são destacadas em *B;* em *C* flores de ipê branco e em *D* árvore de ipê rosa em uma florada abundante, característica das espécies do gênero. (fotos de Marcelo L.L. Martinez).

Algumas dessas espécies de *Tabebuia* que possuem floração anual apresentam florada muito intensa e curta, estratégia de floração denominada de "big bang" por Gentry (1974). Devido a essa característica, os ipês são extremamente ornamentais (Figura 1) e nos últimos anos têm sido utilizados na arborização de ruas e parques (devido ao seu porte não tão grande) e em reflorestamentos destinados à recomposição

de vegetação arbórea (Lorenzi, 1992). São também importantes componentes da vegetação nativa dos biomas Cerrado e Mata Atlântica (Lorenzi 1992).

Muitos desses ipês são de grande importância econômica, devido a sua ampla utilização na indústria madeireira (ferramentas, construções, móveis, dentre outros) e valor paisagístico. Segundo Gentry, 1992, muitas espécies de *Tabebuia* possuem madeiras leves utilizadas como tábua e ripas no Brasil.

Os ipês apresentam número cromossômico diplóide predominante de 2n = 40, sendo os cromossomos pequenos e uniformes. Características como poliploidia e poliembrionia são comuns dentro deste grupo (Ortolani, 2007).

Com relação aos interesses medicinais, tem havido uma série de evidências demonstrando a atividade farmacológica de muitas espécies pertencentes à família Bignoniacea, sugerindo-a como uma "farmácia" das florestas tropicais (Gentry, 1992). Ainda segundo esse autor, muitas espécies dessa família têm sido estudadas, evidenciando propriedades medicinais para o câncer, malária, diabetes, sífilis, hepatites e leishmanias, sendo que os mais famosos relatos são aqueles acerca das propriedades do gênero *Tabebuia* para a cura do câncer (*T. incana, T. impetiginosa, T. serratifolia e T. rosea*).

1.6.2. Tabebuia roseo-alba

Tabebuia roseo-alba (Ridl.) Sand. conhecida popularmente por ipê-branco, pau-d'arco, ipê-do-cerrado (Figuras 1C e 2), possui altura de 7-16m, com uma copa alongada, tronco ereto (de 40-50cm de diâmetro) e casca suberosa, superficialmente fissurada. Suas folhas são compostas trifolioladas, com folíolos levemente pubescentes em ambas as faces (Lorenzi, 1992).

Na América Latina tem ocorrência na Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru e Paraguai. Especificamente no Brasil ocorre na floresta latifoliada semidecídua ao norte dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás. O ipê branco apresenta madeira moderadamente pesada, macia, superfície lustrosa, de ótima durabilidade em ambientes internos. A árvore é extremamente ornamental, não somente pelo exuberante florescimento que pode ocorrer mais de uma vez ao ano (nos meses de agosto a outubro com a planta totalmente despida de folhagem), mas também pela folhagem densa de cor verde azulada em forma piramidal da copa. Os frutos amadurecem a partir de Outubro (Lorenzi, 1992).

Em função de sua adaptação a terrenos secos e pedregosos, *Tabebuia roseo-alba* é muito útil para reflorestamentos neste tipo de ambiente, destinados à recomposição da vegetação arbórea. *T. roseo-alba* é uma planta decídua, heliófita, seletiva xerófita, característica de afloramentos rochosos e calcáreos da floresta semidecídua. Ocorre tanto no interior da mata primária como nas formações secundárias. É esparsamente encontrada na caatinga do nordeste brasileiro e particularmente freqüente nos terrenos cascalhentos das margens do pantanal Matogrossense (Lorenzi, 1992).

T. roseo-alba apresenta sementes cordiformes com leve assimetria nas alas (Figura 2) e diâmetro médio de 2,284 cm ± 0,311 com alas e 0,923 cm ± 0,167 sem alas. O sistema radicular é axial e ramificado (Ortolani, 2007). Ainda segundo essa autora, as sementes iniciam a germinação no quarto dia e não se observa poliembrionia.

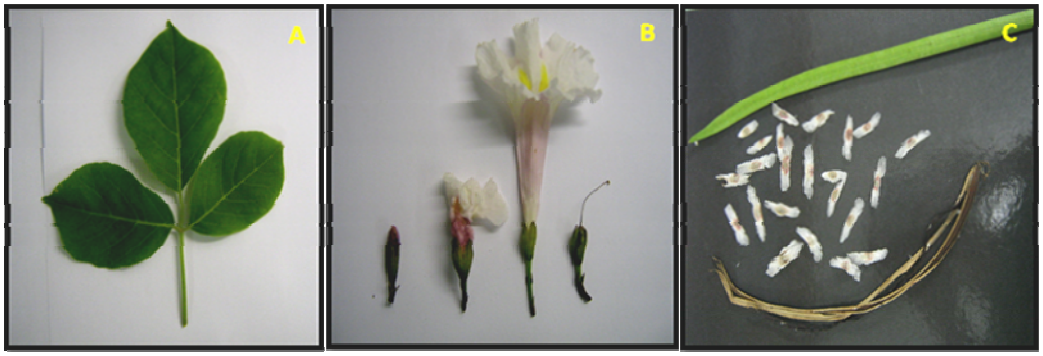

Figura 2. Fotos ilustrativas de *T. roseo-alba*, destacando (*A*) folha trifoliolada, (*B*) diversos estágios do desenvolvimento da flor e (*C*) fruto verde, sementes e fruto seco de ipê branco. (Arquivo pessoal).

Poucos relatos foram encontrados acerca das propriedades medicinais de *T. roseo-alba*. Porém, como muitas espécies desse gênero têm sido apontadas como importantes na indústria farmacológica, é interessante que seja atribuída maior atenção a essa espécie do ponto de vista medicinal.

Finalmente, em um levantamento feito em fragmentos ao longo das bacias dos rios Pardo e Mogi-Guaçu na Região de Ribeirão Preto por Henriques (2003), observou-se que apenas árvores isoladas foram encontradas na região mostrando o claro risco de extinção dessa importante espécie florestal nesta área. Na maioria das vezes, tal espécie foi encontrada apenas em propriedades particulares nas quais o ipê branco foi utilizado para ornamentação. Já na região de Selvíria-MS, o Prof. Dr. Mario Teixeira de Moraes identificou uma população natural de *T. roseo- alba* em bom estado de conservação, mostrando, que, embora raramente, árvores de ipê branco podem ainda ser encontradas crescendo em ambientes naturais.

Assim, cientes de sua importância ecológica, econômica e etnobotânica, somado ao processo de degradação dos ambientes naturais nos quais *T. roseo-alba* ocorre, fica

evidente a importância e a urgência de se realizarem estudos que visem auxiliar a preservação *in situ* e *ex situ* dessa espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a diversidade e divergência genética, a taxas de cruzamento e fluxo gênico entre gerações (adultos e progênies) em populações de *Tabebuia roseo-alba*, procedentes de área urbana de Ribeirão Preto- SP e população natural em Selvíria- MS, usando marcadores microssatélites transferidos.

2.2. Objetivos específicos

1. Verificar a segregação, equilíbrio de ligação, diversidade e poder de exclusão dos locos microssatélites transferidos de *Tabebuia aurea* para *Tabebuia roseo-alba*;

2. Estimar parâmetros de diversidade genética, endogamia e estrutura genética em indivíduos de *T. roseo-alba* presentes em Ribeirão Preto e em Selvíria*;*

3. Estimar parâmetros do sistema de reprodução (como taxas de cruzamento e autofecundação, cruzamento entre parentes, tamanho efetivo de vizinhança reprodutiva e cruzamentos correlacionados) e distância média de fluxo de pólen em populações urbana e natural de *T. roseo-alba*;

4. Contribuir para o mapeamento e conservação da diversidade genética da espécie arbórea tropical *T. roseo-alba.*

3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Para facilitar o entendimento, a dissertação encontra-se dividida em três capítulos. No **Capítulo I** são apresentados os estudos de transferibilidade e caracterização de marcadores microssatélites para *Tabebuia roseo-alba*. O uso desses marcadores para a quantificação da diversidade genética e estruturação de duas populações de *T. roseo-alba* são apresentados no **Capítulo II** e o estudo sobre sistema de cruzamento e fluxo de pólen em duas populações de *T. roseo-alba* no **Capítulo III**.

Capítulo I

Transferibilidade e caracterização de oito locos microssatélites em duas populações da espécie florestal *Tabebuia roseo-alba*

RESUMO

Transferibilidade, herança e desequilíbrio de ligação entre oito locos microssatélites (Tau 12, Tau 15, Tau 16, Tau 19, Tau 21, Tau 22, Tau 27 e Tau 31) desenvolvidos para *Tabebuia aurea* foram estudados em 46 matrizes e 600 progênies de polinização aberta de duas populações de *Tabebuia roseo-alba* procedentes de Ribeirão Preto- SP e Selvíria- MS. Esses oito locos apresentaram condições de amplificação satisfatórias e foram polimórficos. A segregação Mendeliana foi confirmada para os locos e das 28 possíveis combinações entre pares de locos nas matrizes e progênies de cada uma das populações, só foram detectados indícios significativos de desequilíbrio de ligação entre pares de locos nas gerações de progênies. Isso mostra que os locos estão em equilíbrio de ligação e que as populações estão sofrendo um processo de deriva genética. A análise dos oito locos microssatélites revelou um total de 119 alelos, cujo número variou de 8 (Tau 22) a 29 (Tau 15) com uma média de 14,9. As médias das heterozigosidades observada e esperada, foram, respectivamente, 0,520 e 0,852. Todos os locos testados mostraram desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg devido ao excesso de homozigotos e elevados valores de probabilidade de exclusão de paternidade. Esses resultados mostram que os marcadores microssatélites investigados são adequados para estudos de sistema de cruzamento, estrutura genética de populações e análise de paternidade.

1. INTRODUÇÃO

O isolamento de populações em pequenos fragmentos reduz o número de indivíduos reprodutivos, a densidade populacional e pode afetar os principais processos genéticos como fluxo de genes, seleção e sistema de reprodução (Young & Boyle 2000). A resposta das espécies a estes efeitos vai depender das suas características ecológicas, como sistema de reprodução, síndrome de dispersão, longevidade, nível de ploidia e demografia (Young & Boyle, 2000). O estudo genético com marcadores moleculares de gerações de espécies arbóreas pós-fragmentação pode ajudar a evidenciar estes processos e a sugerir medidas mitigadoras.

Com o advento das técnicas modernas da biologia molecular, foram propostos diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA, utilizando-se marcadores moleculares. Muitas das complicações da análise fenotípica podem ser mitigadas através da identificação direta de genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular originado de um gene expresso (como no caso de isoenzimas) ou de um segmento específico do DNA (correspondem a regiões expressas ou não do DNA) (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Entre as classes de marcadores existentes, os marcadores microssatélites ou Seqüências Simples Repetidas (SSR) são os que mais se aproximam do marcador ideal para os estudos de genética de populações Nesta classe de marcadores, a taxa de mutação tem níveis elevados, revelando altos índices de polimorfismo onde outros sistemas de marcadores podem detectar somente níveis baixos da diversidade (Rafalski et al., 1996).

Um dos grandes entraves para utilização de marcadores SSR é o grande investimento e volume de trabalho necessário para o desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de microssatélites de cada espécie, processo que inclui entre outros itens construção de bibliotecas genômicas e sequenciamento de DNA. No entanto, uma alternativa para eliminar o tempo e as despesas envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites para a espécie de interesse é a transferência de *primers* heterólogos. Diversos trabalhos têm demonstrado o sucesso da transferência de marcadores SSR entre espécies do mesmo gênero (Cipriani et al., 1999; Collevatti et al., 1999; Roa et al., 2000; Yamamoto et al., 2001; Alves, 2002; Decroocq et al., 2003; Guidugli et al., 2008) ou entre espécies de gêneros diferentes (Rossetto et al., 2000; Zucchi, 2002). Sendo que em termos gerais, o grau de transferibilidade está diretamente relacionado com o grau de divergência evolutiva entre as diferentes seções e subgêneros.

Não existem marcadores moleculares microssatélites específicos desenvolvidos para *Tabebuia roseo-alba.* Porém, Braga et al., 2006 desenvolveram marcadores SSR para *Tabebuia aurea*, possibilitando a transferibilidade para o ipê branco.

Entretanto, para que esse marcador molecular transferido possa ser usado como um marcador genético é necessário investigar sua segregação, bem como o equilíbrio de ligação entre os locos (Gillet & Hattemer, 1989).

Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi transferir e caracterizar locos microssatélites para espécie florestal *Tabebuia roseo-alba* previamente desenvolvidos para a espécie *Tabebuia aurea*.

Os objetivos específicos foram: a) Verificar a segregação de locos transferidos de *Tabebuia aurea* para *Tabebuia roseo-alba*; b) Verificar o equilíbrio de ligação entre esses pares de locos; c) Quantificar a riqueza alélica e diversidade acessada por esses

marcadores em um conjunto amostral de 645 plantas de *T. roseo-alba;* e d) Avaliar o poder de exclusão desses locos microssatélites para estudos de parentesco.

Este controle de qualidade permitirá validar esses marcadores moleculares como uma ferramenta útil na construção de mapas genéticos, análise de paternidade, fluxo gênico, análise populacional, estudos ecológicos e biologia da conservação (Chase et al., 1996).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Locais de estudo

A amostragem do material biológico para o desenvolvimento desta pesquisa foi realizada em duas áreas distintas.

A primeira delas compreende uma área urbana do município de Ribeirão Preto, interior do Estado de São Paulo, localizada dentro do campus da Universidade de São Paulo (Figura 3). Esta região tem uma altitude média de 600m, temperatura média anual de 22,5^{o}C e 1482mm de precipitação/ano, clima tropical chuvoso com inverno seco e verão quente e é predominantemente ocupada por floresta estacional semidecidual. A maioria dos indivíduos de ipê branco dessa área foi plantada, sendo alguns remanescentes do processo de fragmentação florestal. Estima-se que existam aproximadamente 100 árvores de ipê branco em idade reprodutiva nessa área, distribuídas aleatoriamente no campus, próximas a espécies exóticas e com o fuste pouco encoberto por outras plantas (Figura 3).

A segunda população utilizada é proveniente de uma área preservada de cerrado, na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia/ Unesp – Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria, Estado do Mato Grosso do Sul. A área encontra-se em processo de regeneração florestal desde início da década de 70, quando passou por remoções de camadas de solo para utilização nos aterros da construção da Usina Hidrelétrica de Ilha Solteira, no rio Paraná. Ela abrange aproximadamente 500 ha e possui cerca de 60 indivíduos de ipê branco em fase reprodutiva. O clima da região foi classificado como Aw segundo o sistema de Köeppen, apresentando chuvas no verão e seca no inverno. Demattê (1980) caracterizou o solo original do local como sendo do tipo Latossolo Vermelho-Escuro com textura média (20 – 35 % argila), muito profundo

e rico em sesquióxidos. A região possui características que permitem classificá-la como área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado (Mário Luiz Teixeira, comunicação pessoal).

As árvores de ipê branco amostradas em Selvíria, ao contrário daquelas da população urbana em Ribeirão Preto, possuem o fuste coberto por outras árvores características da vegetação de cerrado e floresta estacional semidecidual (Figura 4). Além disso, da área total florestada, os ipês brancos restringem-se apenas a uma área em uma região mais baixa e úmida.

A área estudada apresenta uma grande diversidade de espécies consideradas importantes para a recuperação de áreas degradadas, principalmente as de cerrado. O Gonçalo-alves *(Astronium fraxinifolium)* destaca-se como uma das espécies com elevado número de indivíduos, revelando grande potencial para regeneração de ambientes degradados.

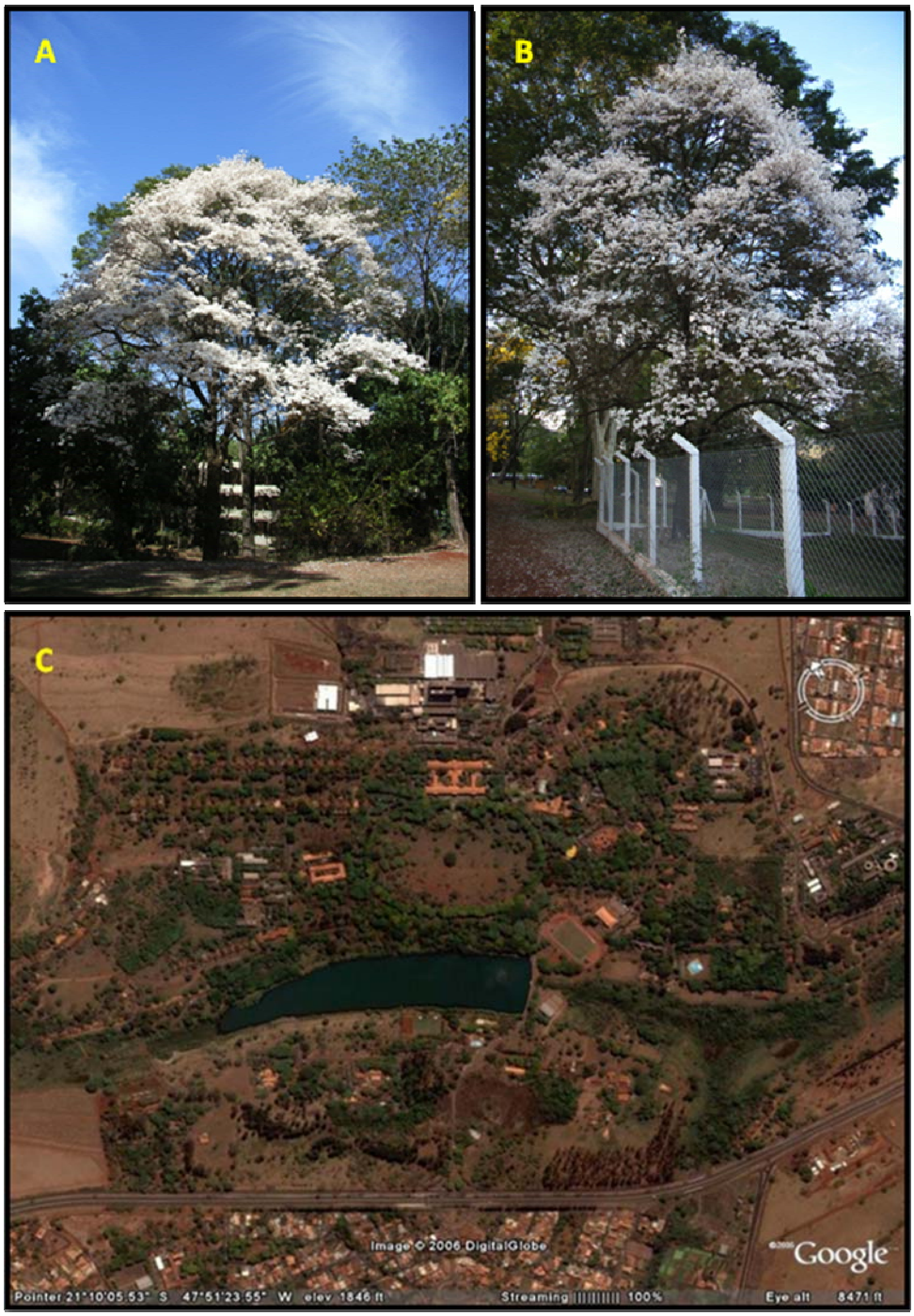

Figura 3: Árvores de ipê branco floridas presentes no campus da USP/RP (*A* e *B*); foto de satélite mostrando a área do campus em que as amostras de ipê branco foram obtidas (*C*).

Figura 4: Foto de parte da floresta da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia/ Unesp (*A*); Árvore de ipê branco, cujos frutos foram coletados, localizada na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia/ UNESP (*B*); Foto de satélite mostrando a área de ocorrência da espécie *T. roso-alba* na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia/ Unesp (*C*).

2.2. Coleta do Material biológico

O material biológico foi constituído por amostras de tecido vegetal foliar da espécie *T. roseo-alba* (ipê branco) de uma população urbana de 22 árvores adultas, coletadas no Campus da USP em Ribeirão Preto- SP e de 24 árvores de uma população natural de Selvíria- MS. Todas as árvores adultas de ambas as populações foram georreferenciadas como pode ser observado nas Figuras 5A e 5B. Além disso, foram coletadas sementes de polinização aberta de 15 matrizes escolhidas aleatoriamente procedentes de cada região. As sementes coletadas foram plantadas no viveiro de mudas da USP/RP nos anos de 2006 (população urbana de Ribeirão Preto) e de 2007 (população natural de Selvíria - MS, ver Figura 6).

Para cada árvore matriz da área urbana de Ribeirão Preto foram obtidas sementes procedentes de um a cinco frutos. Já para a população de Selvíria, para cada árvore foram conseguidas progênies de exatos cinco frutos (quatro amostras/fruto/matriz).

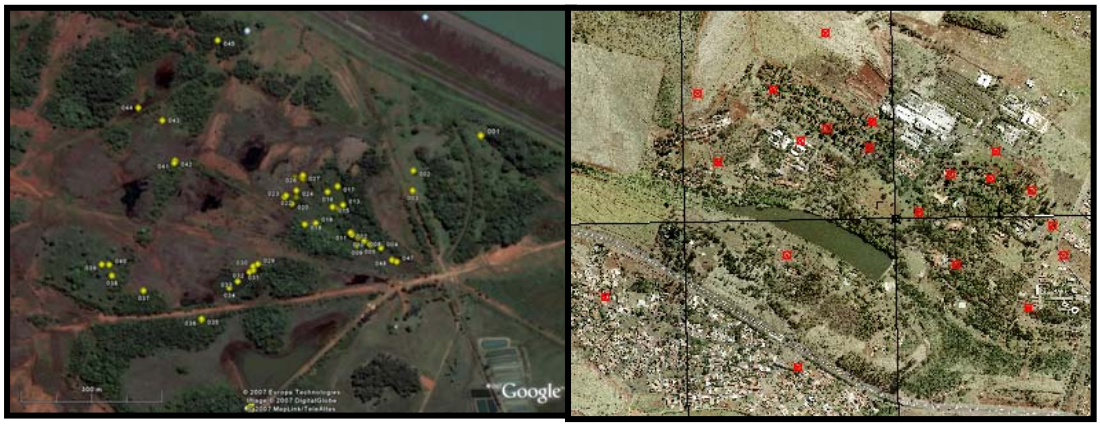

Figura 5: Fotos de satélite mostrando a posição geográfica das árvores de *T. roseo-alba* amostradas para o desenvolvimento deste projeto em (A) Selvíra – MS e (B) Ribeirão Preto-SP.

Portanto a amostragem total desse trabalho consistiu de 46 árvores adultas de ipê branco e 600 juvenis procedentes de polinização aberta de tais matrizes.

2.3. Coleta, armazenamento dos frutos e plantio das sementes

Após a escolha das árvores matrizes a serem utilizadas nesse trabalho, os frutos foram obtidos com o auxílio de tesoura de poda. Tais frutos devem ser preferencialmente colhidos quando estiverem com a casca seca, pouco antes da abertura para liberação das sementes. Esse procedimento garante a obtenção de uma semente já formada, com o embrião suficientemente desenvolvido para o plantio. As síliquas coletadas foram acondicionadas em sacos de papel separados e identificados (um fruto por saco) para a manutenção da correspondência entre fruto e mãe.

Após a coleta dos frutos seguiu-se a etapa de secagem e plantio das sementes. Após secas ao ar livre, as sementes foram plantadas em tubetes de plástico contendo substrato e adubo adequados. Em cada tubete foram depositadas duas sementes de mesma procedência, com identificação e colocados em bandejas que comportam até 154 tubetes (Figura 6). Após o plantio, as sementes e as posteriores mudas foram irrigadas uma vez por dia no período da manhã.

Figura 6: Germinação das sementes de ipê branco coletadas em Selvíria-MS. Em *A* e *B* pode-se visualizar as bandejas com os tubetes onde as sementes foram plantadas e as placas com a identificação da matriz e fruto; em *C* observam-se as cotilédones e o primeiro par de folhas verdadeiras da espécie *T. roseo- alba*.

As sementes de ipê branco provenientes de ambas as localidades tiveram um tempo de germinação médio de 7 a 10 dias, semelhante ao descrito na literatura por Santos et al. (2005).

Decorrido um tempo após o início da germinação (por volta de 15 dias após o plantio), os tubetes foram analisados com o objetivo de identificar aqueles que apresentaram germinação de mais de uma semente. Neste caso, a muda mais sadia foi mantida no tubete e a outra foi removida e replantada, um procedimento denominado "repique de mudas".

Após o desenvolvimento das primeiras folhas (cerca de 30 dias após o plantio) foram coletadas amostras de parte das pequenas folhas verdadeiras da espécie, as quais foram acondicionadas em papel de alumínio, identificadas e posteriormente congeladas em *freezer* -20°C para a extração do DNA.

2.4. Extração e quantificação do DNA

O DNA das folhas amostradas foi extraído com base na metodologia de Doyle e Doyle (1990), modificada por Alzate-Marin et al. *in press*), no Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro modelo Spectronic Genesys 5, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Para estimar a quantidade de DNA, tomou-se como referência que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por mL (Sambrook et al., 1989) e aplicou-se a seguinte fórmula:

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

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

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

f = 8,33 (fator de diluição).

Obteve-se boa qualidade e um bom rendimento (cerca de 260 a 312 ng/µL de DNA a partir de 250-300 mg de tecido foliar das árvores de ipê branco) de DNA em todas as amostras utilizadas.

2.5. Transferibilidade de marcadores microssatélites

No presente trabalho foram testados dez marcadores microssatélites (Tabela 1) desenvolvidos para a espécie *Tabebuia aurea* (Braga et al., 2006) e amplificados em *T. roseo-alba* (Feres et al., *in press).*

Tabela 1: Sequências dos *Primers* SSR testados para a transferibilidade em *T. roseo-alba.*

Loco SSR	Elementos repetidos	Sequências do *primer* 5´ - 3´
Tau 12	$(TC)_8(TA)(TG)_{29}$	F: CATCATCAAGGTCAAGATCA R: CATTCTAGTCTTCCATAAGT
Tau 13	$(TC)_{22}(ACTCCC)(TC)_4(AC)_{11}$	F: CCATCTCAATGCTTAACAGT R: TTGCAATGCTACCATACA
Tau 15	$(AG)_{32}$	F: TTTGAGGGGTTGAAGCATTT R: CATTGTGGTCCCTCTCAACA
Tau 16	$(CT)_{33}(CA)_{11}$	F: GCTTGTAGCAACGTTAGGTTT R: TGTGCATTGTGACTACCAGCTA
Tau 19	$(GA)_{33}$	F: AGGGCAAGCTTTTCCAGTTT R: TTCCTCACACGGATATGTCG
Tau 21	$(GA)_{26}$	F: CTTTTGGGGGTCTTTGGAAT R: GAAAGAGACAGAGACAAAGATACA
Tau 22	$(CT)_{18}(CCCTCTCGTCA)(GT)_3$	F: TATCTCTCCGCCGTACACCT R: CCAATCGAAGAGCCCATTTA
Tau 27	$(CT)_{24}(CA)_8(CC)\ (CA)_7$	F: GGTAAATCATCTTCCGCTTCC R: ACTGCAGAATCGCCTTTTGT
Tau 28	$(CT)_{33}$	F: TCAGCCACTACACAACCAAAG R: GGGAAGCAATGGAGTCAAAA
Tau 31	$(CT)_{28}(CA)_{10}(CTT)(GT)_5$	F: TCGTGCAGCTTTTGAGTCTG R: CTGCAAAACACAAAAGCGAAA

2.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi utilizada DNA polimerase (*Taq*) na concentração de 1 U/µL em tampão de estocagem e dNTP estoque, contendo quatro soluções separadas de 100 mM de cada base (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 8,3, sendo ambos reagentes da marca Biotools – B e M Labs, AS. Uma solução trabalho de dNTPs com 2,5 mM foi obtida diluindo-se, com água MilliQ autoclavada, a solução estoque (100 mM) de cada dNTP para uma

solução única. Os iniciadores (*Primers forward* e *reverse*) específicos para cada loco foram diluídos em água milliQ autoclavada, ficando à 50 μM (Bio-Synthesis). Da solução inicial dos *primers* foi formada uma solução de trabalho (2,5 μM), em que foram adicionados 10 μL do *primer forward*, 10 μL do *primer reverse* e 180 μL de água MiliQ autoclavada. Foram utilizados também $MgCl_2$ na concentração de 50 mM e Tampão PCR livre de $MgCl_2$, contendo Tris/HCl 75 mM pH 9,0, KCl 50 mM e $(NH_4)_2SO_4$ 20 mM (Biotools – B e M Labs, AS).

O equipamento utilizado para a PCR foi o termociclador Mastercycler® Eppendorf. A seqüência geral das condições de amplificação foi a seguinte: 1 ciclo a 96°C por 3 minutos, 30 ciclos: 94°C por 30 segundos, 49-56 °C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo: 72°C por 7 minutos, 22°C indefinidamente. Para cada reação foi mantido um tubo contendo água MilliQ como controle negativo. Foram realizados ensaios de temperaturas de anelamento entre 49 e 56 °C a fim de avaliar a melhor temperatura para amplificação de cada *primer*.

2.7. Ensaios de amplificação multiplex

Com a finalidade de otimizar a genotipagem dos indivíduos analisados nesse projeto, três sistemas de PCR biplex foram testados: Tau21/Tau22, Tau12/Tau16 e Tau15/Tau19. Esses ensaios foram feitos em um volume total de 15μl. Todos os reagentes (tampão, dNTP, *primers* – solução de trabalho, $MgCl_2$ e a Taq - DNA polimerase), com exceção do DNA, foram misturados em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações. As quantidades exatas de cada um desses reagentes para cada um dos testes de PCR biplex estudados estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições de PCR para 3 biplex da espécie *T. roseo-alba.*

Reagentes	Locos		
	Tau21/Tau22	Tau12/Tau16	Tau15/Tau19
DNA (10ng/uL)	3,75uL	3,75uL	3,75uL
dNTP (2,5mM)	1,5uL	1,5uL	1,5uL
Tampão	1,5uL	1,5uL	1,5uL
$MgCl_2$ (50mM)	0,45uL	0,45uL	0,675uL
Primers (2,5uM)	1,8uL de cada *primer*	1,8uL de cada *primer*	1,8uL de cada *primer*
Taq (1U/uL)	0,3uL	0,3uL	0,45uL
Água	3,9uL	3,9uL	3,525uL
Volume final	15uL	15uL	15uL
Temperatura de anelamento	56°C	50°C	50°C

2.8. Eletroforese

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida, podendo ser de glicerol (não desnaturantes) e uréia (desnaturantes). As amplificações para a escolha da temperatura de anelamento dos *primers* microssatélites foram primeiro separadas em géis de glicerol contendo um padrão de 10 pb (Invitrogen) para confirmação da região de amplificação esperada. Tais géis não desnaturantes 10 % (20 mL) possuem: 1,4 mL de glicerol, 9,72 mL de H_2O destilada, 6,7 mL de solução acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 2,0 mL de TBE (10X), 15 μL de TEMED (tetrametiletilenodiamina- Pharmacia Biotech) e 300 μL de solução de persulfato de potássio.

Após a escolha da temperatura de anelamento e a confirmação da região de amplificação, as separações dos produtos de PCR foram feitas em géis de poliacrilamida desnaturantes para a determinação fenotípica.

Tais géis de poliacrilamida desnaturantes 10% (30 mL) continham: 14,4 g de uréia, 10,0 mL solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 3,0 mL de TBE (10X – 108,0 g de Tris; 53,0 g de ácido bórico; 40,0 mL de solução de EDTA pH 8,0; completar o volume para 1 litro de H_2O), 22,5 μL de TEMED, 450 μL de solução de persulfato de potássio e água destilada).

Os géis desnaturantes polimerizados foram montados em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE (1X – 100 mL Tampão TBE (10X); 900 mL H_2O) em ambos os pólos (porção superior e inferior). Esta cuba foi conectada a uma fonte de eletroforese Amershan Pharmacia Biotech (EPS 1001), ajustada à corrente elétrica de 26 mA constante durante 4h, necessária para uma boa separação dos fragmentos amplificados.

Antes da aplicação das amostras (produtos de PCR) para a separação eletroforética, estas foram submetidas às condições de desnaturação em um tratamento prévio com formamida: foram colocados 7 μL de tampão de amostra (900 μL de bromofenol, 900 μL xilenocianol, 900 μL TBE (10X), 4,5 mL de Ficol 30 % diluído em água destilada, 1,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 3,6 g de sacarose; na proporção de 3:1 com formamida) em tubo *eppendorf*, junto com 5 μL do produto amplificado. Estes tubos foram aquecidos a 94 ^{o}C por 7 minutos e subseqüentemente colocados em banho de gelo (tratamento desnaturante), seguindo-se à aplicação no gel.

2.9. Coloração do gel com nitrato de prata e secagem

A coloração do gel foi realizada de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti et al. (1994):

- Fixação: após a retirada das placas de vidros e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200 mL de solução fixadora (160 mL de etanol (PA), 7,0 mL de ácido acético glacial (PA) e 833 mL de água);
- Impregnação com nitrato de prata: adicionou-se 3,0 mL de solução de nitrato de prata (2 g de nitrato de prata, 10 mL de água destilada) e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada adequadamente e o gel lavado em água por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água;
- Revelação: 200 mL solução reveladora (22 g de NaOH, 1 litro de água) foram despejadas cuidadosamente no recipiente contendo o gel juntamente com 1,5 mL de formaldeído, sendo submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução reveladora foi pré-aquecida em forno de microondas por 3 minutos em potência máxima para facilitar a reação de coloração;
- Bloqueio da reação: após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 200 mL de solução fixadora.
- Após a conclusão do processo de revelação dos fragmentos amplificados, os géis foram secos em papel celofane para análise e posterior armazenagem.

2.10. Determinação fenotípica

Os alelos de todos os locos para cada um dos indivíduos coletados foram identificados por ordem crescente de tamanho, definida pela migração eletroforética, ou

seja, os alelos de menor tamanho migram mais rápidos e os de maior tamanho têm uma migração mais lenta.

2.11. Análises estatísticas

2.11.1. Análise da herança e de desequilíbrio de ligação dos locos

Neste trabalho adotou-se o método descrito por Gillet & Hattemer (1989) para estudar a herança dos marcadores microssatélites transferidos para *T. roseo-alba*, no qual se comparam os alelos das árvores maternas heterozigotas com suas progênies de polinização aberta. As pressuposições do modelo de Gillet & Hattemer (1989) são que toda a progênie de uma árvore materna A_iA_i deve possuir o alelo A_i da árvore mãe. Em caso de uma árvore mãe heterozigota (ex. A_iA_j, $i \neq j$) procedeu-se da seguinte maneira: a) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i, A_j; b) o número de progênies heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) deve ser igual a soma das progênies homozigotas A_iA_i (N_{ii}) e A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$, e c) o número de progênies heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$ ($k \neq i, j$). A análise genética foi realizada com 30 árvores matrizes (15 de cada região de coleta), cada uma com 20 progênies de polinização aberta. Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1, usando um teste G (Sokal & Rohlf, 1981) com um grau de liberdade. Posteriormente, todos os testes individuais foram somados e um teste G total foi obtido ($\sum G_{Total_1:1}$), com *n* graus de liberdade, sendo *n* o número de progênies usadas no teste. Simultaneamente, os fenótipos observados foram somados e um teste G agrupado para a segregação 1:1 ($G_{1:1_agrupado}$), com um grau de liberdade,

foi realizado. A hipótese nula desse teste é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de genótipo heterozigoto. Em seguida, testou-se a hipótese de heterogeneidade de segregação entre progênies, usando-se um teste G de heterogeneidade ($G_{Heterogeneidade}$), obtido pela subtração do teste G agrupado do teste G total. Esses testes são aditivos de forma que $\sum G_{Total_1:1} = \sum G_{Heterogeneidade} + \sum G_{1:1_agrupado}$ com n, n-1 e 1 grau de liberdade, respectivamente.

O Desequilíbrio de ligação é um procedimento estatístico que analisa a recombinação das freqüências entre pares de locos para determinar se dois locos não segregam independentemente. Caso isso ocorra, significa que o número de marcadores microssatélites utilizados no trabalho não são oito como foi assumido e sim um número menor, de acordo com o número de ligações.

Dessa forma, o teste de desequilíbrio de ligação foi realizado entre todos pares de locos (adultos e progênies) com base em uma estatística *G* de razões de logaritmos de máxima-verossimilhança. A significância estatística foi calculada com base em 1000 permutações e usando uma correção seqüencial de Bonferroni (95%, α=0,05). Tais análises foram calculadas com o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) usando o método de permutação (10.000 reamostragens). Esses testes permitiram determinar quais os locos são adequados para as análises genéticas populacionais.

2.11.2. Análise da diversidade genética, equilíbrio de Hardy-Weinberg e endogamia

A diversidade genética da geração adulta (46) e das progênies (600) foi caracterizada pelos índices: número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade

observada (H_o), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = 1/(1-\hat{H}_e)$). Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996):

$$\hat{F} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e},$$

Além disso, calculou-se a probabilidade de exclusão do primeiro [$\Pr(Ex_1)$] e segundo parentes [$\Pr(Ex_2)$]. Estes índices de diversidade, probabilidade de exclusão de paternidade e o índice de fixação foram obtidos utilizando o programa CERVUS 3.0 (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007). A significância estatística dos valores médios entre locos do índice F foi calculada por permutação (10.000), usando o programa FSTAT (Goudet, 2002).

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as freqüências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_ix_j + x_j^2$$

Em que:

x_i^2 é a freqüência esperada dos homozigotos do alelo i;

$2x_ix_j$ é a freqüência esperada do heterozigoto ij;

x_j^2 é a freqüência esperada dos homozigotos para o alelo j.

Assim, a aderência das freqüências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com o emprego do programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000).

3. RESULTADOS

3.1. Transferibilidade de *primers* SSR de *Tabebuia aurea* para *Tabebuia roseo-alba*

Dos dez pares de *primers* SSR previamente desenvolvidos para *Tabebuia aurea* e testados em *Tabebuia roseo-alba*, nove pares amplificaram regiões SSR com sucesso. Dos *primers* transferidos oito foram escolhidos para o desenvolvimento desse trabalho. As condições de amplificação utilizadas estão descritas em Feres et al., *in press* (Anexo 1) e resumidas na tabela 3.

Tabela 3: Tabela contendo os *primers* de ipê branco padronizados e usados nesse estudo e a temperatura de anelamento da PCR.

Loco SSR	Elementos repetidos	Temperatura de Anelamento do *primer* em °C
Tau 12	$(TC)_8(TA)(TG)_{29}$	50
Tau 15	$(AG)_{32}$	50
Tau 16	$(CT)_{33}(CA)_{11}$	50
Tau 19	$(GA)_{33}$	50
Tau 21	$(GA)_{26}$	56
Tau 22	$(CT)_{18}(CCCTCTCGTCA)(GT)_3$	56
Tau 27	$(CT)_{24}(CA)_8(CC)\ (CA)_7$	49
Tau 31	$(CT)_{28}(CA)_{10}(CTT)(GT)_5$	56

3.2. PCRs biplex testadas

Dos três conjuntos de PCR biplex testados, somente os conjuntos Tau21/Tau22 e Tau15/Tau19 foram satisfatoriamente úteis (Figura 7). O biplex Tau12/Tau16 sofreu sobreposição dos produtos de amplificação, e não pôde ser utilizado nesse trabalho.

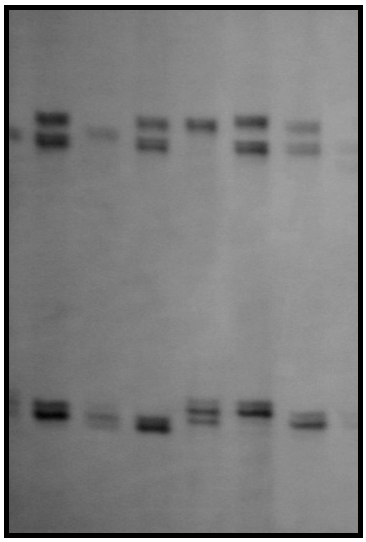

Figura 7: Gel de poliacrilamida 10% contendo amostras de PCR biplex dos *primers* Tau 21 (amostras superiores no gel) e Tau 22 (amostras inferiores no gel).

3.3. Análise da herança

Os valores da soma dos testes *G* individuais da segregação esperada total 1:1 ($\sum G_{Total_1:1}$), agrupando as progênies de árvores maternas de mesmo genótipo para o loco sob consideração são apresentados na Tabela 4.

O teste de segregação para locos em heterozigose nas matrizes pôde ser realizado 75 vezes. Destes 75 casos em 57 (76%) foi confirmada a segregação Mendeliana esperada 1:1.

Os locos Tau 12 e Tau 31 não apresentaram nenhum desvio de segregação para nenhuma das famílias segregantes analisadas; o loco Tau 15 apresentou desvio apenas nas famílias 302 e 321 e o loco Tau 22 apresentou um discreto desvio apenas em uma análise agrupada. Já o loco Tau 16 apresentou desvio de segregação 1:1 na família 301 e também na análise agrupada. No loco Tau1 9 foram observadas 4 famílias de 9 (44,4 %) em desacordo com as proporções de segregação 1:1. Ainda nesse loco, foi possível

constatar desvio de segregação em todas as análises agrupadas. O loco Tau 21 também apresentou desvio de segregação em todas as análises agrupadas e na maioria das famílias estudadas. Por último, o loco Tau 27 apresentou desvios de segregação em quatro famílias (36,36 %) e em todas as análises agrupadas.

Dessa forma, a maioria dos locos foi consistente com a hipótese 1:1 de razão de segregação. Portanto, pode-se afirmar que esses locos possuem uma herança codominante com razão 1:1.

Tabela 4: Testes *G* para hipótese de segregação codominante 1:1 em oito locos SSR de Ipê branco.

Loco/família	**Genótipo materno**	n_{ij}	n_{ii}	n_{jj}	$\mathbf{n_1}$	n_{ik}	n_{jk}	$\mathbf{n_2}$	$G_{(1:1)}$ (GL=1)	**G'**
Tau12										
312	1_9	09	06	03		0	0		---	---
317	1_9	11	05	04		0	0		0,20	---
319	1_9	08	01	08		03	0		0,06	---
Agrupado		28	12	15	55	03	0	03	0,02	---
601	3_50	0	04	0		09	05		---	1,16
602	3_50	08	06	04		01	01		0,22	---
609	3_50	04	04	04		06	02		1,36	---
Agrupado		12	14	08	34	16	08	24	2,99	2,72
Tau 15										
302	10_11	4	10	3		2	1		5,02*	0,34
317	10_11	20	0	0		0	0		---	---
313	10_11	10	3	1		4	2		2,66	0,68
321	10_11	5	10	3		0	1		3,68*	---
318	10_11	9	4	3		3	0		0,25	---
Agrupado		48	27	10	85	9	4	13	1,43	1,97
308	10_16	6	4	2		7	2		---	2,94
304	10_16	1	1	1		10	8		0,34	0,22
Agrupado		7	5	3	15	17	10	27	0,07	1,84
312	11_16	1	0	3		6	10		1,05	1,01
320	11_16	7	5	2		2	3		---	0,20
Agrupado		8	5	5	18	8	13	21	0,22	1,20
305	4_11	0	0	0		11	8		---	0,48
319	4_11	7	1	4		4	4		0,33	---
Agrupado		7	1	4	12	15	12	27	0,33	0,33
Tau 16										
301	1_50	0	0	0		15	5		---	5,23*
305	1_50	0	2	0		11	5		---	2,31
321	1_50	7	7	2		2	1		0,25	0,34
Agrupado		7	9	2	18	28	11	39	0,90	7,66 **
303	3_5	7	0	5		0	5		0,33	---
304	3_5	8	7	5		0	0		0,81	---
Agrupado		15	7	10	32	0	5	5	0,13	---
310	6_50	0	7	6		0	7		---	---
320	6_50	0	7	3		6	4		---	0,40
Agrupado		0	14	9	23	6	11	17	---	1,49
613	1_2	3	2	6		4	5		2,36	0,11
603	1_2	7	0	2		5	6		2,94	0,09
Agrupado		10	2	8	20	9	11	20	-	0,20

Tabela 4. Continuação.

Loco/matriz	Genótipo materno	n_{ij}	n_{ii}	n_{jj}	$\mathbf{n_1}$	n_{ik}	n_{jk}	$\mathbf{n_2}$	$G_{(1:1)}$ (GL=1)	G’
Tau 19										
305	5_10	20	0	0		0	0		---	---
303	5_10	7	11	1		0	5		1,33	---
Agrupado		27	11	1	39	0	5	5	5,92*	---
304	5_9	1	6	1		3	4		5,06*	0,14
312	5_9	5	4	9		1	0		3,68*	---
320	5_9	4	7	1		1	7		1,36	5,06*
Agrupado		10	17	11	38	5	11	16	8,88**	2,31
319	7_10	0	0	1		9	10		---	0,05
307	7_10	3	2	11		1	1		6,74*	---
Agrupado		3	2	12	17	10	11	21	7,72**	0,05
313	5_7	8	3	1		8	0		1,36	---
321	5_7	7	6	3		2	1		0,25	0,34
Agrupado		15	9	4	28	10	1	11	0,14	8,55**
Tau 21										
305	6_7	1	3	7		3	5		8,55**	0,51
320	6_7	1	4	9		4	1		12,2**	1,93
Agrupado		2	7	16	25	7	6	13	20,72**	0,08
603	1_3	1	0	1		3	10		---	3,98*
607	1_3	15	1	0		2	1		14,70**	0,34
Agrupado		16	1	1	18	5	11	16	12,40*	2,31
605	2_5	6	2	4		0	4		---	---
606	2_5	1	0	9		1	5		7,36*	2,91
612	2_5	11	4	5		0	0		0,20	---
614	2_5	4	4	2		2	8		0,40	3,85*
Agrupado		22	10	20	52	3	17	20	1,24	10,82**
Tau 22										
302	3_5	11	4	1		1	2		2,31	0,34
304	3_5	5	5	3		1	5		0,70	2,91
312	3_5	9	0	11		0	0		0,20	---
307	3_5	9	3	6		0	2		---	---
Agrupado		34	12	21	67	2	9	11	0,01	4,82*
317	4_6	9	5	5		0	0		0,05	---
313	4_6	7	4	7		2	0		0,90	---
Agrupado		16	9	12	37	2	0	2	0,68	---

Tabela 4. Continuação.

Loco/matriz	Genótipo materno	n_{ij}	n_{ii}	n_{jj}	n_1	n_{ik}	n_{jk}	n_2	$G_{(1:1)}$ (GL=1)	G'
Tau 27										
302	1_50	7	6	1		2	4		---	0,68
307	1_50	0	6	4		3	7		---	1,65
Agrupado		7	12	5	24	5	11	16	4,30*	2,31
321	4_7	5	4	11		0	0		5,23*	---
304	4_7	2	3	0		10	2		0,20	5,82*
312	4_7	4	7	7		0	0		5,88*	---
609	4_7	5	3	0		5	7		0,51	0,33
Agrupado		16	17	18	51	15	9	24	7,25**	1,52
310	1_3	4	1	9		6	0		2,66	---
318	1_3	2	12	6		3	5		14,7**	0,51
Agrupado		6	13	15	34	9	5	14	15,45**	1,16
611	2_50	3	4	3		7	2		1,65	2,94
612	2_50	6	9	0		0	5		0,60	---
607	2_50	4	5	4		2	5		1,97	1,33
Agrupado		13	18	7	38	9	12	21	3,86*	0,43
Tau 31										
302	2_4	11	2	7		1	2		0,20	0,34
303	2_4	9	11	0		0	5		0,20	---
304	2_4	6	0	8		4	2		0,29	0,68
305	2_4	11	3	4		0	1		0,90	---
307	2_4	7	2	2		5	3		0,83	0,51
320	2_4	8	5	5		1	1		0,22	---
321	2_4	10	3	1		0	0		2,66	---
319	2_4	6	3	8		0	0		1,49	---
318	2_4	4	11	2		0	0		3,02	---
Agrupado		72	40	37	149	11	14	25	0,17	0,36
609	5_11	0	1	0		8	8		---	---
601	5_11	7	1	1		6	4		2,94	0,40
Agrupado		7	2	1	10	14	12	26	1,65	0,15
605	3_5	5	0	2		6	4		1,33	0,40
613	3_5	6	3	3		2	4		---	0,68
Agrupado		11	3	5	19	8	8	16	0,48	-
607	3_11	4	7	0		4	5		0,83	0,11
614	3_11	8	5	0		4	3		0,70	0,14
Agrupado		12	12	0	24	8	8	16	-	-

** $P<0,01$; * $P<0,05$.

n_{ij}, $n_{ii}+n_{jj}$ são os números observados de heterozigotos e homozigotos, respectivamente

n_{jk} são os números observados de genótipos heterozigotos do tipo *ik* e *jk*, respectivamente.

n_1 e n_2 são os números de fenótipos encontrados

3.4. Análise de desequilíbrio de ligação

No teste de desequilíbrio de ligação feito através do programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2002) usando a correção de Bonferroni foram detectados poucos indícios de desequilíbrio de ligação nos locos de *T. roseo-alba* (Tabela 5). Das 28 possíveis combinações entre pares de locos nas matrizes e progênies de cada uma das populações, só foram detectados indícios significativos de desequilíbrio gamético entre os pares de locos nas gerações de progênies. Nas gerações adultas não foram detectados indícios de ligação entre os pares de locos e pode-se afirmar que os alelos de diferentes locos não estão associados e segregam independentemente.

Tabela 5: Desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de T. roseo-alba. Os valores na tabela são as probabilidades após 1000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,000446.

Pares de locos	RIB_Prog	RIB_Ad	SEL_Prog	SEL_Ad
Tau 12 X Tau 15	0,00045	0,54554	0,00045	1,00000
Tau 12 X Tau 16	0,00045	0,55982	0,00045	0,77143
Tau 12 X Tau 19	0,00045	0,41518	0,00045	1,00000
Tau 12 X Tau 21	0,00045	0,43973	0,00045	1,00000
Tau 12 X Tau 22	0,00045	0,78259	0,00045	0,11161
Tau 12 X Tau 27	0,00045	0,69688	0,00045	0,09866
Tau 12 X Tau 31	0,00045	0,26384	0,00045	0,45179
Tau 15 X Tau 16	0,00045	0,44241	0,00045	1,00000
Tau 15 X Tau 19	0,00045	0,09152	0,00045	1,00000
Tau 15 X Tau 21	0,00045	0,64643	0,00045	1,00000
Tau 15 X Tau 22	0,00045	0,22455	0,00045	0,20893
Tau 15 X Tau 27	0,00045	0,72902	0,00045	1,00000
Tau 15 X Tau 31	0,00045	0,07321	0,00045	1,00000
Tau 16 X Tau 19	0,00045	1,00000	0,00045	0,35759
Tau 16 X Tau 21	0,00045	0,20357	0,00045	1,00000
Tau 16 X Tau 22	0,00045	0,43750	0,00045	0,60357
Tau 16 X Tau 27	0,00045	0,89420	0,00045	0,74375
Tau 16 X Tau 31	0,00045	0,62634	0,00045	1,00000
Tau 19 X Tau 21	0,00045	0,53705	0,00045	0,24107
Tau 19 X Tau 22	0,00045	0,70179	0,00045	0,14464
Tau 19 X Tau 27	0,00045	0,37991	0,00045	0,06339
Tau 19 X Tau 31	0,00045	0,84241	0,00045	1,00000
Tau 21 X Tau 22	0,00045	0,76429	0,00045	0,16875
Tau 21 X Tau 27	0,00045	1,00000	0,00045	1,00000
Tau 21 X Tau 31	0,00045	0,12679	0,00045	1,00000
Tau 22 X Tau 27	0,00045	0,15670	0,00045	0,35670
Tau 22 X Tau 31	0,00045	0,43795	0,00045	1,00000
Tau 27 X Tau 31	0,00045	0,92723	0,00045	0,01295

RIB_Prog é a amostra composta pelas progênies de Ribeirão Preto;

RIB_Ad é a amostra composta pelas árvores adultas de Ribeirão Preto

SEL_Prog é a amostra composta pelas progênies de Selvíria

SEL_Ad é a amostra composta pelas árvores adultas de Selvíria

3.5. Análise da diversidade genética, Equilíbrio de Hardy-Weinberg e endogamia na amostra total

Durante a análise o número de indivíduos amostrados variou de 605 a 630 (do total de 646). Esta diferença na amostragem é atribuída a problemas de rotina laboratorial devido à qualidade do DNA (presença de impurezas) e sua diluição, que acarretam falhas na amplificação de determinados locos SSR. Apesar disso, o número de indivíduos usados para as análises pode ser considerado excelente.

Para os oito locos analisados, 119 alelos foram identificados entre todos os indivíduos estudados. O número de alelos por locos variou de 8 (Tau 22) a 29 (Tau 15) com uma média de 14,9 alelos/locos (Tabela 6). O número efetivo de alelos por locos foi menor do que o número médio de alelos por locos, variando de 4,5 (Tau 22) a 12,35 (Tau 15) alelos, com média de 7,29 alelos/locos. Isso indica que muitos alelos são raros (freqüências menores ou iguais a 5%). De fato, poucos alelos nos oito locos tiveram freqüência superior a 25% e, em geral, dois a quatro alelos tinham freqüência maior do que 10% e os demais eram raros (Figura 8).

Tabela 6: Diversidade genética, endogamia e poder de exclusão de locos microssatélites em árvores de *Tabebuia roseo-alba*. *n* é o número de indivíduos analisados; *k* é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F é o índice de fixação; $\Pr(Ex_1)$ e $\Pr(Ex_2)$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro parente (quando um dos parentes é conhecido) e o segundo parente (quando nenhum dos parentes é conhecido).

Loco	n	K	A_e	H_o	H_e	F	$\Pr(Ex_1)$	$\Pr(Ex_2)$
Tau 12	619	11	7,14	0,417	0,860	0,515	0,440	0,280
Tau 15	630	29	12,35	0,798	0,919	0,132	0,277	0,162
Tau 16	614	9	5,85	0,453	0,829	0,454	0,514	0,341
Tau 19	613	16	7,63	0,529	0,869	0,391	0,416	0,261
Tau 21	607	17	8,06	0,633	0,876	0,277	0,400	0,249
Tau 22	624	8	4,50	0,282	0,778	0,638	0,599	0,418
Tau 27	610	14	6,58	0,413	0,848	0,513	0,457	0,294
Tau 31	605	15	6,21	0,608	0,839	0,275	0,481	0,314
Média	--	14,9	7,29	0,520	0,852	0,394	--	--
Total	645	119	--	--	--	--	0,998631	0,999961

A heterozigosidade observada variou de 0,282 (Tau 22) a 0,798 (Tau 15), com média de 0,520. A heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi maior em todos os locos e para média dos locos, variou de 0,778 (Tau 22) a 0,919 (Tau 22), com média de 0,852 (Tabela 6).

O índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero em todos os locos e para média dos locos, variando de 0,132 (Tau 15) a 0,638 (Tau 22), com média de 0,394 (Tabela 6), sugerindo desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a excesso de homozigotos, provavelmente endogamia.

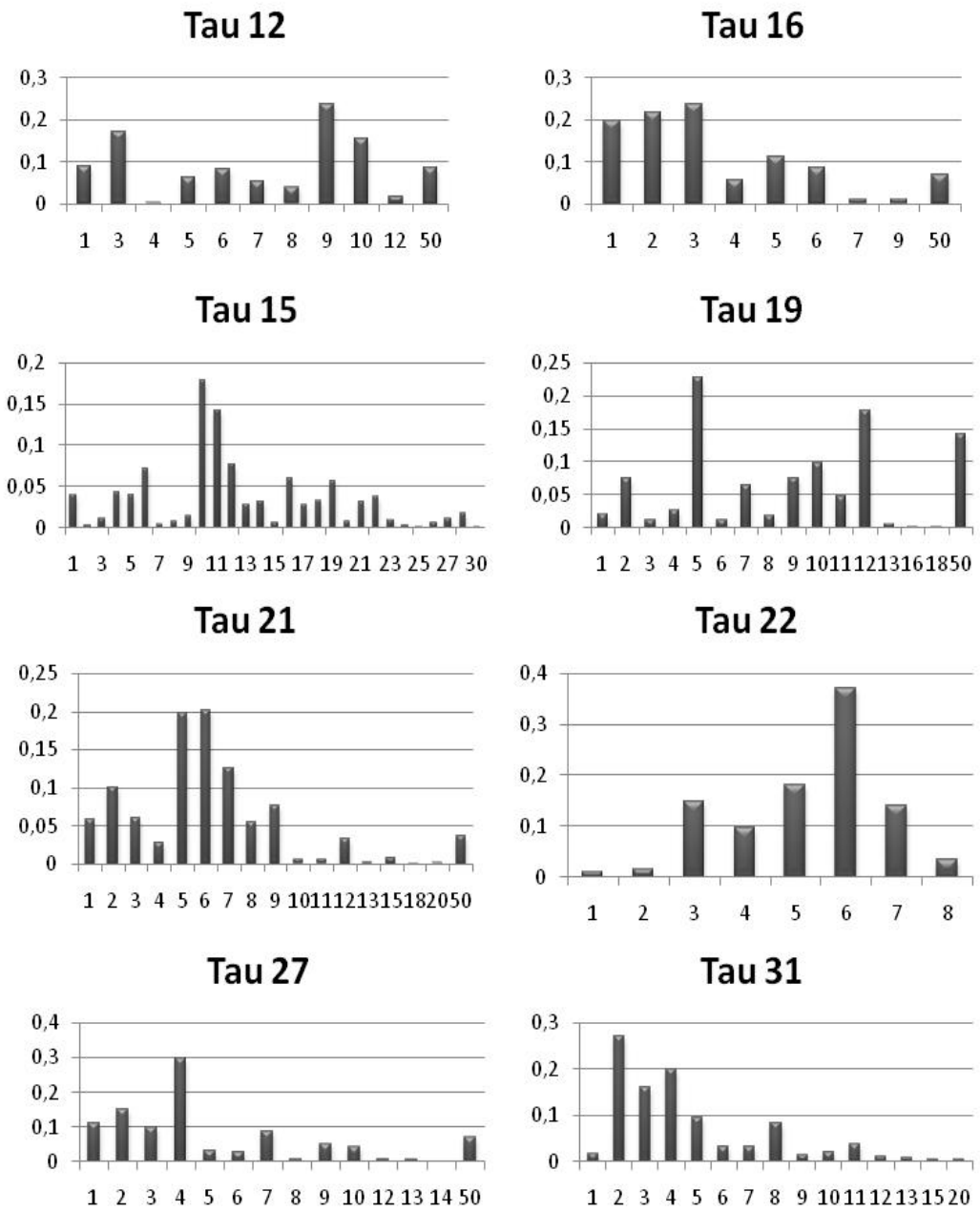

Figura 8. Distribuição das freqüências dos alelos nos oito locos microssatélites analisados nas amostras de *Tabebuia roseo-alba.*

O poder de exclusão total para identificação de um candidato a pai em uma progênie arbitrária, quando nenhum dos pais é conhecido ($\Pr(Ex_1)$) foi estimado em

0,998631. Quando é conhecido o genótipo de um dos pais, a probabilidade de exclusão ($\Pr(Ex_2)$) do conjunto de locos utilizado é de 0,999961 (Tabela 6). Isto indica que o poder de exclusão de tais locos é adequado para a análise de parentesco, especialmente análises de paternidade.

Os locos foram também testados quanto à aderência ao Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW). Weir (1996) esclarece que a análise de dados genéticos deve ser baseada em algum modelo ou teoria. O modelo clássico que embasa a genética de populações é chamado de Teorema de Hardy-Weinberg (EHW). Este teorema presume que uma população de tamanho infinito, onde os indivíduos se acasalam aleatoriamente e que não sofre ação de forças perturbadoras (mutação, migração, seleção) estabelece freqüências genotípicas binomiais, que, não irão se alterar nas gerações subseqüentes. Os desvios das proporções esperadas pelo EHW significam que uma ou mais das pressuposições do modelo foram alteradas (Futuyma, 1992).

No presente trabalho, através da análise de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, observou-se que todos os oito locos utilizados mostraram desvios das proporções do EHW em pelo menos um dos conjuntos amostrais (Tabela 7). Ao comparar as heterozigosidades esperada e observada, fica claro que esses desvios foram causados pelo excesso de homozigotos, apontado também pelos altos índices de fixação.

Tabela 7. Probabilidades obtidas com o teste exato de Fisher para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações de *T. roseo-alba.*

Amostra	Tau 12	Tau 15	Tau 16	Tau 19	Tau 21	Tau 22	Tau 27	Tau 31
RIB_Prog	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
RIB_Ad	0.000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0.028 *	0.0281*	0.00031*
SEL_Prog	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
SEL_Ad	0,000*	0.8406	0.0006*	0,000*	0.092*	0,000*	0,000*	0.476

*Desvio significativo ($p < 0,05$)

RIB_Prog é a amostra composta pelas progênies de Ribeirão Preto;

RIB_Ad é a amostra composta pelas árvores adultas de Ribeirão Preto

SEL_Prog é a amostra composta pelas progênies de Selvíria

SEL_Ad é a amostra composta pelas árvores adultas de Selvíria

4. DISCUSSÃO

4.1. Sucessos de transferência dos Marcadores Microssatélites

Apenas o loco Tau 28 não foi amplificado nas amostras de *T. roseo-alba* usadas neste trabalho. Assim, conseguiu-se um sucesso de 90% nos testes de transferibilidade. Em termos gerais, a chance de sucesso na transferibilidade (amplificação heteróloga) de seqüências de DNA por PCR é inversamente relacionada à distância evolutiva entre as duas espécies (Zucchi et al., 2003). Pesquisas de FitzSimmons et al. (1995) constataram que pode-se conseguir uma eficiência superior a 50% em espécies que apresentam um tempo de divergência entre 15-25 milhões de anos, comparada a 6,2 % em um tempo de divergência entre 80-100. Porém, a eficiência na utilização está mais fortemente relacionada à taxa de evolução molecular do que ao tempo de divergência. Portanto, a porcentagem obtida nesse trabalho foi possível, principalmente, por se tratar de uma amplificação heteróloga entre espécies do mesmo gênero, muito aparentadas evolutivamente.

4.2. Análise da herança e de desequilíbrio de ligação

Os desvios de segregação observados na descendência das referidas árvores (Tabela 4) podem ter sido causados por erro de amostragem, devido ao pequeno tamanho amostral usado para o teste (20 progênies/família). Além disso, segundo Gillet & Gregorius (1992), as distorções de segregação podem ser pré-zigóticas (ocorrem entre a meiose e a fusão dos gametas) ou pós-zigóticas (ocorrem entre a fertilização e o momento de acesso ao genótipo do indivíduo). De acordo com esses autores, as distorções pré-zigóticas podem ser causadas por: deriva meiótica (maior quantidade de um tipo de gameta do que de outro para um genótipo heterozigoto); viabilidade seletiva gamética (o tipo gamético presente no produto da meiose difere em sua habilidade de

sobreviver para o estágio de fertilização) e sucesso diferencial (auto-incompatibilidade gamética). Já as distorções pós-zigóticas são causadas por viabilidade seletiva pós-zigótica (como a seleção contra homozigotos), que alteram o padrão de segregação gamética. Para avaliar precisamente se um desses casos está ocorrendo é necessário um estudo genético de sementes e plântulas, para que as análises da freqüência de segregação entre os tipos gaméticos considerem a possibilidade de ocorrer mortalidade entre os estágios de zigoto.

Outra explicação para esses desvios de segregação é a presença de alelos nulos ou dominância entre alelos. Por se tratar de locos transferidos (heterólogos) a probabilidade de ocorrência de alelos nulos é maior nessas espécies do que nas espécies em que os marcadores foram desenvolvidos (Kim et al., 2004). A presença de alelos nulos é devido a alterações no sítio de anelamento dos *primers* microssatélites acarretando em erros na caracterização dos indivíduos (indivíduos heterozigotos são caracterizados como homozigotos). A presença de alelos nulos ou alelos dominantes são difíceis de serem demonstrados, exigindo experimentos específicos como descritos por Morand et al., (2002).

Contudo, quando progênies revelando desvios significativos foram excluídas das análises, nenhum desses locos revelou heterogeneidade de segregação. Além disso, a maioria dos locos foi consistente com a hipótese 1:1 de razão de segregação. Assim, como o ideal é que os testes de segregação sejam baseados em grandes amostras (> 20 plantas por progênie), a fim de reduzir a chance de se detectar desvios de segregação devido à variação amostral aleatória, novos testes baseados em grande número de descendentes por árvore materna heterozigota são desejados para confirmar os presentes resultados.

Foram encontrados indícios de ligações entre locos somente nas gerações de progênies. Resultado significativo de ligação entre locos apenas em uma geração é indicativo de deriva genética ou desequilíbrio gamético e não ligação física entre os locos. Além disso, este fato pode ter ocorrido também por insuficiência amostral ou pode indicar algum tipo de seleção a favor de alguns alelos nas árvores matrizes. Contudo, estudos de ligação entre locos são importantes porque geralmente os locos ligados tendem a gerar vícios nas estimativas, por aumentarem o peso de um padrão.

Assim, pode-se considerar que todos os locos avaliados apresentaram herança mendeliana simples e nenhum dos pares de locos parece estar em desequilíbrio de ligação.

4.3. Análise de diversidade, EHW e endogamia

A riqueza alélica encontrada nesse trabalho (14,9 alelos/locos) foi semelhante àquela encontrada em outras Bignoniaceas como *T. aurea* (18,8) (Braga et. al, 2006) e *Jacaranda copaia* (13,3) (Jones et al., 2005). Se comparado com a média de alelos por locos em espécies analisadas com *primers* heterólogos, o valor é notavelmente maior, como por exemplo, para *Acca sellowiana* (média = 4.9) (Santos et al., 2007) e *Pyrus communis L* (média 6,6) (Wunsch et al., 2007).

O índice de diversidade genética em *T. roseo-alba* (0,852) também foi menor que o encontrado por Braga et al. (2006) em *T. aurea* (0.913), mas é maior que os relatados em outras espécies florestais da América do Sul: *Carapa guianensis* (H_E = 0.61, Dayanandan et al., 1999), *Swietenia humilis* (H_E = 0.53, White et al., 1999), *S. macrophylla* (H_E = 0.66, Novick et al., 2003) e *Solanum lycocarpum* (H_E = 0.33, Martins et al., 2006). Comparando com outros trabalhos realizados com *primers* transferidos, o índice de diversidade em *T. roseo-alba* foi maior que em *Acca*

sellowiana (H_E = 0.64, Santos et al. 2007) e *E. dysenterica* (H_E = 0.44, Zucchi et al. 2002). Isso mostra que embora os índices de riqueza alélica e diversidade genética tenham sido menores que aqueles encontrados na espécie para quais os *primers* microssatélites foram desenvolvidos (como é esperado), tais índices estão de acordo com os relatados em outras espécies arbóreas.

Ao comparar as heterozigosidades observada e esperada pode-se concluir que os desvios de EHW foram causados pelo excesso de homozigotos, provavelmente originados por cruzamento biparental, autofecundação e/ou efeito Wahlund (redução da heterozigosidade devido à população estar estruturada em subpopulações) nas populações estudadas.

Esse excesso de homozigotos reflete em um elevado e significativo índice de fixação, confirmando endogamia nas amostras. Análises de sistema de cruzamento nessas populações serão discutidas nos tópicos seguintes do trabalho.

Outra explicação para os altos níveis de endogamia observados pode ser o a presença de alelos nulos nos locos microssatélites. Alelos nulos aumentam o número de indivíduos supostamente homozigotos, visto que apenas um dos alelos amplifica em caso de plantas heterozigotas para o alelo nulo.

5. CONCLUSÕES

Através das análises realizadas pode-se concluir que:

1) Oito locos microssatélites estudados podem ser usados em estudos genéticos na espécie arbórea florestal *Tabebuia roseo-alba*: Tau 12, Tau 15, Tau 16, Tau 19, Tau 21, Tau 22, Tau 27 e Tau 31; Esses oito locos SSR apresentaram segregação mendeliana;

2) Não foram detectados indícios significativos de ligação entre os locos analisados. Isto mostra que eles são adequados para estudos de sistema de cruzamento, estrutura genética de populações e análise de paternidade;

3) A diversidade genética dos locos nas amostras estudadas foi semelhante à encontrada em *Tabebuia aurea* e outras espécies arbóreas florestais;

4) Todos os locos apresentaram um excesso de homozigotos nas populações analisadas.

Capítulo II

Diversidade e divergência genéticas em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl) Sand.

RESUMO

A diversidade e a diferenciação genética de duas populações (uma urbana em Ribeirão- SP e uma natural em Selvíria- MS) de *Tabebuia roseo-alba* (ipê branco) sob diferentes condições de conservação foram acessadas utilizando oito locos microssatélites (Tau 12, Tau 15, Tau 16 e Tau 19, Tau 21, Tau 22, Tau 29 e Tau 31). O número médio de alelos por loco nas duas populações, tanto na geração de adultos quanto na de progênies, variou de 6,5 (adultos de Ribeirão Preto) a 12,88 (progênies de Selvíria). A heterozigosidade observada, no conjunto amostral, variou de 0,482 (população de progênies de Ribeirão Preto) a 0,635 (população de adultos de Ribeirão Preto). A heterozigosidade esperada foi mais elevada sendo o menor valor (0,743) encontrado nas progênies de Ribeirão Preto; enquanto a população de adultos de Selvíria apresentou o maior valor desta estimativa (0,835). Para todos os conjuntos amostrais o índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero. Os níveis de divergência genética entre as populações foram altos e com tendência a aumentar quando comparadas às gerações de progênies. Os resultados sugerem que a fragmentação provoca diminuição na riqueza e aumento na divergência genética de populações de ipê branco.

1. INTRODUÇÃO

O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (Allcock et al., 1995). Em curto prazo, a perda de variabilidade genética pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional (Seoane et al., 2000) e em longo prazo, a redução da riqueza alélica deve limitar a habilidade das espécies a responderem às mudanças devidas à ação de forças seletivas (Ellstrand & Ellan, 1993). Populações naturais normalmente têm níveis altos de variação genética, que é introduzida continuamente nelas por mutação ou migração de indivíduos de outras populações (Matioli, 2001).

Estudos genéticos visando à análise de estrutura populacional e o entendimento da estrutura genética das espécies existentes nos fragmentos florestais remanescentes são fundamentais para a escolha correta das estratégias de manejo e conservação a serem adotados (Seoane et al., 2000). O conhecimento da distribuição da variação genética entre e dentro de populações é também de fundamental importância quando a espécie for manipulada geneticamente, dado que o sucesso de um método de seleção, visando o melhoramento genético, ou a amostragem visando à conservação dependerá da magnitude da variação genética disponível na população e do sistema reprodutivo da espécie (Fonseca, 1982).

No caso de plantas, o fluxo gênico ocorre através do pólen e sementes transportados pela fauna e outros meios (como o vento, por exemplo) de uma população para a outra. A mutação gênica é fonte de produção de variabilidade nova (visto que somente através dela surgem alelos novos) e o fluxo gênico pode aumentar a variabilidade de uma população pela entrada de alelos anteriormente inexistentes na

mesma, ou pela entrada de alelos já presentes, porém em freqüências muito diferentes daquelas da população residente (Freitas & Bered, 2003).

Assim, os objetivos do presente capítulo foram comparar a diversidade e estrutura genética entre duas gerações de *T. roseo- alba* provenientes de uma paisagem urbana e de uma população natural localizadas em Ribeirão Preto (SP) e Selvíria (MS), respectivamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material biológico e análise do DNA

A amostragem feita para os objetivos propostos nesse capítulo foi a mesma descrita no capítulo1, subitem 3.2: 22 árvores matrizes procedentes de Ribeirão Preto-SP, (com suas 300 progênies de polinização aberta) e 24 árvores matrizes procedentes de Selvíria- MS (também com suas respectivas 300 progênies de polinização aberta). As regiões de coleta podem ser geograficamente melhor observadas na Figura 9.

O material biológico foi constituído por amostras de tecido vegetal foliar de ipê branco conservado em freezer -20 °C até o momento da extração de DNA [metodologia de Doyle e Doyle (1990), modificada por Alzate-Marin et al. *In press*]. O DNA foi acessado com oito pares de *primers* microssatélites transferidos de *Tabebuia aurea* (Tau 12, Tau 15, Tau 16 e Tau 19, Tau 21, Tau 22, Tau 29 e Tau 31).

Os protocolos de amplificação, condições de PCR e eletroforese foram similares aos descritos no capítulo 1 subitens 3.5 e 3.6. Em geral, para as amplificações de PCR, 2,5 ng de DNA genômico foram usados em um volume final de 10 µL contendo: 0,3 µM de cada *primer*, 1 U *Taq* DNA polimerase, 0,25 mM de cada dNTP, tampão de reação livre de $MgCl_2$ [75 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl e 20 mM $(NH_4)_2SO_4$] e 1,5 mM $MgCl_2$. O programa de PCR usado para a amplificação das regiões microssatélites consistiu de 96°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a *T*a °C (49-56°C) por 1 min, e 72°C por 1 min; seguido por uma extensão final a 72°C por 7 min. Um sistema multiplex com os *primers* Tau 21/ Tau 22 e Tau 15/ Tau 19 foi utilizado. Os produtos de PCR foram desnaturados e separados em géis depoliacrilamida 10%, corados, posteriormente, com nitrato de prata.

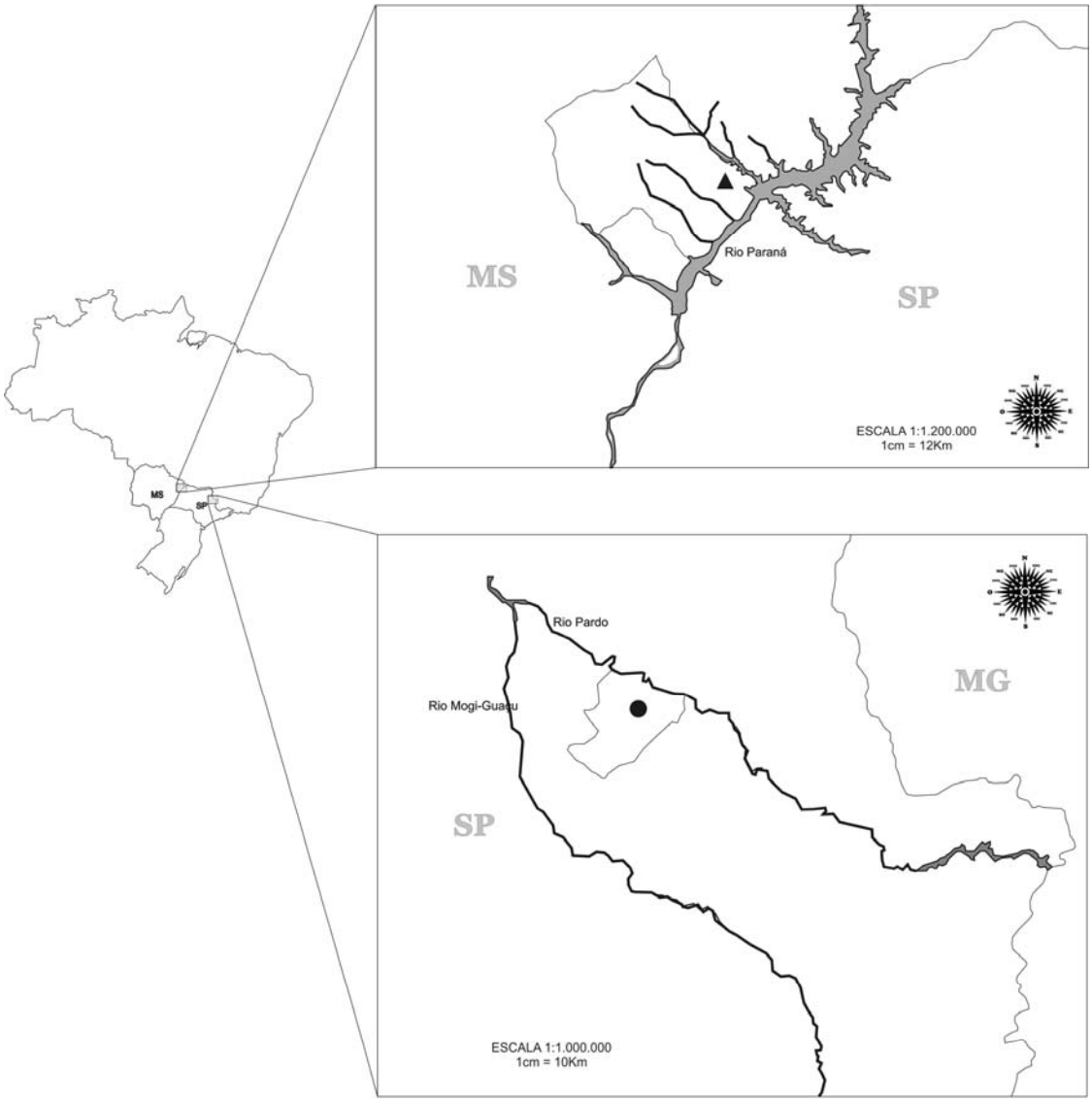

Figura 9. Localização geográfica das áreas de coleta de matrizes de *Tabebuia roseo-alba*: (●) Ribeirão Preto- SP e (▲) Selvíria- MS.

2.2. Análises estatísticas

2.2.1. Análise da diversidade genética e endogamia

A diversidade genética da geração adulta e das progênies foi caracterizada pelos índices: número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o),

heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = 1/(1-\hat{H}_e)$). Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996):

$$\hat{F} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e}.$$

Estes índices de diversidade e o índice de fixação foram calculados utilizando o programa CERVUS 3.0 (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007). A significância estatística dos valores médios entre locos do índice F foi calculada por permutação (10.000), usando o programa FSTAT (Goudet, 2002).

2.2.2. Estrutura genética entre as populações

A estrutura genética entre as populações de adultos e de progênies de *T. roseo-alba*, amostradas em paisagem urbana e natural, foi acessada através de dois métodos: estatística F_{ST} clássica de Nei (1977) e estatística G_{ST} de Hedrick (2005) através do programa GDA_NT (Degen, 2006).

3. RESULTADOS

3.1. Diversidade genética

Os resultados da média da variação genética nas populações adultas e de progênies de *T. roseo–alba* estão apresentados na Tabela 8. A diversidade genética discriminada por loco e por população encontra-se nas Tabelas dos Anexos 2 e 3.

Através da análise da Tabela 8 nota-se que nas duas populações (Ribeirão e Selvíria), tanto na geração de adultos quanto na de progênies, o conjunto de locos revelou um elevado número de alelos, variando de 6,5 (adultos de Riberirão Preto) a 12,88 (progênies de Selvíria). Em todas as populações o número efetivo de alelos foi menor que o encontrado, mostrando que existem alelos em baixa freqüência.

Tabela 8. Diversidade genética e endogamia de locos microssatélites em árvores adultas e progênies de *Tabebuia roseo-alba*. K é o número total de alelos; *R* é a riqueza alélica; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; F é o índice de fixação.

	RIB_Prog (ep 95%)	RIB_Ad (ep 95%)	SEL_Prog (ep 95%)	SEL_Ad (ep 95%)
K	9,25 (2,93)	6,50 (1,17)	12,88 (4,78)	10,75 (2,91)
R	6,81 (1,15)	6,45 (1,15)	9,05 (2,56)	10,29 (2,56)
Ae	4,211 (0,80)	4,630 (1,00)	6,284 (2,61)	7,194 (2,27)
Ho	0,482 (0,12)	0,635 (0,10)	0,545 (0,17)	0,621 (0,19)
He	0,743 (0,06)	0,761 (0,06)	0,793 (0,08)	0,835 (0,05)
F	0,351 *	0,166 *	0,313 *	0,256 *

*: $P<0,05$;

RIB_Prog é a amostra composta pelas progênies de Ribeirão Preto;

RIB_Ad é a amostra composta pelas árvores adultas de Ribeirão Preto

SEL_Prog é a amostra composta pelas progênies de Selvíria

SEL_Ad é a amostra composta pelas árvores adultas de Selvíria

ep 95% é o erro padrão calculado com 95 % de confiança

Conforme pode ser visto na Tabela 8, a heterozigosidade observada, no conjunto amostral, variou de 0,482 (população de progênies de Ribeirão Preto) a 0,635 (população de adultos de Ribeirão Preto). As estimativas de diversidade (heterozigosidades esperadas) foram mais elevadas. O menor valor de heterozigosidade esperada foi atribuído a população de progênies de Ribeirão Preto (0,743) enquanto a população de adultos de Selvíria (0,835) apresentou o maior valor desta estimativa.

Para todos os conjuntos amostrais o índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero. A média do índice de fixação variou de 0,166 (população de adultos de Ribeirão Preto) a 0,351 (população de progênies de Ribeirão Preto) sugerindo excesso de homozigotos.

Com relação à presença de alelos exclusivos, foi constatado um número expressivo (24) nas populações, sendo 5 da população de adultos de Ribeirão Preto, 6 da população de progênies de Ribeirão Preto, 2 da população de adultos de Selvíria e 11 da população de progênies de Selvíria (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição de alelos privados nas populações de ipê branco de Ribeirão Preto e Selvíria nas gerações de adultos e progênies.

Loco	Alelo	Frequência	Amostra
Tau 15	2	0.006873	SEL_Prog
Tau 15	25	0.001718	SEL_Prog
Tau 15	20	0.017182	SEL_Prog
Tau 15	24	0.006873	SEL_Prog
Tau 15	23	0.018900	SEL_Prog
Tau 15	30	0.003436	SEL_Prog
Tau 15	8	0.017007	RIB_Prog
Tau 15	61	0.020833	SEL_Ad
Tau 19	18	0.001718	SEL_Prog
Tau 19	16	0.023810	SEL_Ad
Tau 21	18	0.001859	SEL_Prog
Tau 21	13	0.005034	RIB_Prog
Tau 21	20	0.003356	RIB_Prog
Tau 21	50	0.068792	RIB_Prog
Tau 21	15	0.016779	RIB_Prog
Tau 22	13	0.023810	RIB_Ad
Tau 22	11	0.238095	RIB_Ad
Tau 22	16	0.095238	RIB_Ad
Tau 22	10	0.214286	RIB_Ad
Tau 27	12	0.017921	SEL_Prog
Tau 27	14	0.003584	SEL_Prog
Tau 27	11	0.025000	RIB_Ad
Tau 31	15	0.010714	SEL_Prog
Tau 31	20	0.008865	RIB_Prog

RIB_Prog é a amostra composta pelas progênies de Ribeirão Preto;
RIB_Ad é a amostra composta pelas árvores adultas de Ribeirão Preto
SEL_Prog é a amostra composta pelas progênies de Selvíria
SEL_Ad é a amostra composta pelas árvores adultas de Selvíria

Quando são comparadas as duas gerações de uma mesma população (progênies e adultos) nota-se que para ambas as localidades (Ribeirão Preto e Selvíria) houve uma redução no número efetivo de alelos, na heterozigosidade observada e na heterozigosidade esperada na geração de progênies. Assim, percebe-se que houve uma perda de diversidade genética entre as gerações.

3.2. Estrutura genética entre as populações

A divergência genética entre as duas populações de adultos e de progênies de ipê branco estudadas foi examinada através de duas ferramentas estatísticas. A Tabela 10 apresenta os valores de divergência genética entre as duas gerações para as duas estimativas: estatística *F* de Nei (F_{ST}) e de Hedrick (G_{ST}).

Tabela 10. Parâmetros de diferenciação genética entre as populações de *T. roseo-alba* nas gerações de adultos e progênies. O *Hs* é a heterozigosidade esperada média entre as populações; *Ht* é a heterozigosidade esperada total para o conjunto das populações; o F_{ST} é a diferenciação genética entre as populações segundo Nei; G_{ST} é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.

Loco/Geração	Progênies				Adultos			
	Hs	Ht	F_{st}	*Gst*	Hs	Ht	F_{ST}	G_{ST}
Tau 12	0,767	0,860	0,108**	0,819**	0,776	0,868	0,105**	0,833**
Tau 15	0,875	0,914	0,043**	0,645**	0,850	0,893	0,048**	0,592**
Tau 16	0,780	0,828	0,058**	0,469**	0,808	0,860	0,061**	0,574**
Tau 19	0,780	0,864	0,097**	0,785**	0,867	0,915	0,052**	0,730**
Tau 21	0,829	0,876	0,054**	0,578**	0,851	0,880	0,032**	0,398**
Tau 22	0,628	0,774	0,189**	0,827**	0,738	0,815	0,094**	0,624**
Tau 27	0,792	0,851	0,069**	0,594**	0,791	0,828	0,044**	0,377**
Tau 31	0,693	0,840	0,175**	0,965**	0,704	0,838	0,16**	0,921**
Médial	0,768	0,851	0,098	0,747	0,798	0,862	0,074	0,659

*: $P<0,05$; **: $P<0,01$.

Como pode ser observado na tabela 10 a heterozigosidade esperada média entre as populações e a heterozigosidade esperada total para o conjunto das populações em ambas as gerações foi alta. Isso reflete em um positivo e significativo valor de divergência genética entre elas.

Os resultados para divergência genética mostraram diferenças entre os métodos aplicados. A estimativa de Nei (F_{st}) sugeriu uma baixa variação entre os grupos (9,8 % da variação genética entre as progênies e 7,4 % da variação genética entre os adultos). Em contraste, as estimativas de Hedrick (G_{ST}) mostraram elevadas diferenças entre as populações (74,7 % da variação genética entre as progênies e 65,9 % da variação genética entre os adultos).

4. DISCUSSÃO

4.1. Diversidade genética e índice de fixação

No conjunto amostral, uma redução no número de alelos por locos, no número efetivo de alelos por locos, na riqueza alélica e no índice de diversidade do ambiente natural em Selvíra para o ambiente urbano fragmentado de Ribeirão Preto (em ambas as gerações) foi observada. Pode-se notar uma diminuição mais acentuada na riqueza alélica que nas demais estimativas. Isso porque a riqueza alélica é mais sensível a redução populacional causada pela fragmentação florestal do que a heterozigosidade devido à eliminação preferencial de alelos raros que contribuem pouco para esta estimativa (Cournuet & Luikart, 1996). A riqueza alélica, nesse sentido, pode refletir com maior precisão os atuais níveis de diversidade genética dos remanescentes florestais (Cournuet & Luikart, 1996, Varvio et al. 1986).

Tais perdas de riqueza alélica têm sérias implicações na sobrevivência da espécie. Assim, o diagnóstico e a manutenção da variabilidade genética podem ser fundamentais para a sobrevivência de espécies comprometidas, pois a perda desta variabilidade afetará diretamente a adaptação das populações, diminuindo a proliferação continuada de espécies dentro dos sistemas tropicais (Fonseca, 1982).

A diminuição da riqueza alélica observada entre o ambiente urbano e o natural pode também refletir o isolamento dos indivíduos de Ribeirão Preto. Os três efeitos genéticos da fragmentação mais óbvios são: *a*) perda de diversidade genética no nível de população e espécie; *b*) o aumento da estrutura genética entre as populações e; *c*) aumento da endogamia (Young & Boyle, 2000). Imediatamente após a fragmentação, com a redução do tamanho das populações, tem-se um efeito de gargalo na diversidade genética das espécies, pela redução no número de indivíduos nas populações. Esta redução pode causar a perda de alelos e redução na heterozigosidade (Young *et al.*,

1996). Isto afeta diretamente as futuras gerações das populações, porque reduz o número de indivíduos reprodutivos, desencadeando a deriva genética no processo de recombinação dos gametas a cada geração.

Por exemplo, Jump & Peñuelas (2006) observaram na regeneração de fragmentos de *Fraxinus exselsa* um aumento nos níveis de endogamia em comparação a geração adulta, em populações de florestas contínuas, demonstrando claramente os efeitos da fragmentação afetando as gerações subseqüentes pelo processo de deriva genética.

O índice de fixação foi alto e significativo em todos os conjuntos amostrais, sugerindo excesso de homozigotos e que algum processo está levando à endogamia nessas populações, tais como cruzamento entre parentes, deriva genética (efeito Wahlund) ou segregação de alelos nulos. As análises de sistema de cruzamento e fluxo gênico, que esclarecem melhor esses valores serão expostas no próximo capítulo.

Observa-se que a população de adultos de Ribeirão Preto foi a que apresentou menores valores de índice de fixação. Isso pode ser reflexo da heterogeneidade da população, composta por árvores remanescentes da fragmentação florestal e de árvores plantadas, com sementes podendo ser derivadas de diferentes locais. Já em Selvíria, em se tratando de uma população natural, pode haver estruturação populacional, favorecendo o cruzamento entre parentes.

No entanto, de uma forma geral, observa-se que ambas as populações apresentam níveis altos de diversidade genética. Isso chama a atenção para a potencialidade de estudos conservacionistas em populações urbanas remanescentes e até plantadas como detentoras de variabilidade genética. O presente trabalho evidencia que as árvores urbanas usadas podem também serem utilizadas como árvores matrizes para a obtenção de sementes, facilitando o trabalho de coleta. Além disso, destacamos que

ecossistemas urbanos constituem ambientes fragmentados, e podem proporcionar uma boa oportunidade para estudar o impacto da fragmentação nos sistemas ecológicos.

4.2. Estrutura genética

Os dois métodos estatísticos utilizados para analisar a estrutura genética entre as populações de ipê branco mostraram diferenças evidentes de valores. Isso porque o primeiro método (F_{st} de Nei) é indicado apenas para genes com alelos com alta freqüência. Como, no presente trabalho, o marcador utilizado (microssatélite) produz um grande número de alelos, muito deles em baixa freqüência, tal estimativa pode apresentar valores não representativos da realidade (Hedrick, 2005). A estatística de Nei mede a variação entre os grupos em relação à variação total da população, mas sem especificar a identidade dos alelos envolvidos. Em contrate, a estatística de Hedrick (2005) mede a diferenciação entre as populações levando em consideração a freqüência e o tipo de alelo. Devido a esse fato, tal método acusa altos valores. Portanto, a medida de Hedrick (2005) pode ser considerada mais específica para microssatélites e será considerada como a hipótese mais plausível para a divergência genética.

Sendo assim, os resultados mostram uma alta divergência genética entre as populações estudadas. Além disso, ao analisar a geração de progênies percebe-se que há uma tendência em aumentar ainda mais essa diferenciação.

Teoricamente, a fragmentação pode reduzir o tamanho populacional e aumentar a diferenciação entre populações por elevar a deriva genética e a endogamia e restringir o fluxo gênico entre elas (Young et al., 1996). O ipê branco tem ampla distribuição geográfica e espera-se que em populações isoladas e distantes (como é o caso das estudadas no presente trabalho) exista uma elevada diferenciação.

Tais resultados são importantes na tomada de decisões conservacionistas. Há basicamente dois tipos principais de opções de conservação, conservação *in situ* e conservação *ex situ*. Dentre essas, a conservação *in situ* é considerada a mais adequada por manter a espécie no seu ambiente natural permitindo a continuidade dos processos evolutivos. Por outro lado, quando a conservação *in situ* é impraticável a conservação *ex situ* deve ser implementada (Dias & Kageyama, 1991). Como as populações mostraram elevado grau de diferenciação é importante que as estratégias de conservação de ipê branco sejam desenvolvidas localmente, mantendo as duas populações.

5. CONCLUSÕES

De um modo geral, podemos concluir que:

1. Há uma tendência em se encontrar maior diversidade genética entre árvores de ipê branco no ambiente natural contínuo que na população urbana fragmentada;

2. Houve uma enorme diferença entre as estimativas de divergência genética, sugerindo que o *Gst* de Hedrick seja o mais adequado para os estudos com microssatélites;

3. Há grande diferenciação genética entre as populações de Ribeirão Preto e Selvíria, provavelmente ocasionada pela fragmentação florestal (e, conseqüentemente, deriva genética) e distância geográfica entre elas;

4. Finalmente, destacamos a importância dessa pesquisa que coloca a biodiversidade urbana como um ponto importante a ser tido em conta nas estratégias de conservação.

Capítulo III

Sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação

RESUMO

Sistema de cruzamento e fluxo de pólen são elementos muito importantes para o entendimento da estrutura genética de espécies de árvores. Neste trabalho foram utilizados marcadores microssatélites para investigar o sistema de cruzamento e o fluxo de pólen em duas populações distintas de *Tabebuia roseo-alba* (ipê branco), localizadas em Ribeirão Preto- SP e em Selvíria- MS. Para este fim foram amostradas 30 árvores matrizes e suas 600 progênies de polinização aberta. A análise do sistema de cruzamento, usando o modelo misto, permitiu afirmar que as populações estudadas são mistas (t_m Ribeirão Preto = 0,840 e t_m Selvíria = 0,963) com tendência de aumento de autofecundação nas árvores isoladas da população urbana. Significantes desvios do cruzamento aleatório foram observados através do cruzamento entre parentes ($t_m - t_s$ Ribeirão Preto = 0,368 e $t_m - t_s$ Selvíria = 0,398) e cruzamentos correlacionados entre frutos ($r_{p(m)d}$ Ribeirão Preto = 0,824 e $r_{p(m)d}$ Selvíria = 0,665) e dentro de frutos ($r_{p(s)}$Ribeirão Preto = 0,811 e $r_{p(s)}$Selvíria = 0,579), indicando endogamia nas populações. O número efetivo de doadores de pólen foi muito baixo para um mesmo fruto (1,21 em Ribeirão Preto e 1,50 em Selvíria) e mais alto entre frutos de uma mesma árvore (8,20 em Ribeirão preto e 9,8 em Selvíria). A distância média do fluxo de pólen acessada pela análise TWOGENER foi baixa nas duas populações tanto para o modelo normal (35,4m em Ribeirão Preto e 57,3m em Selvíria) quanto para o exponencial (39,9m em Ribeirão Preto e 64,6m em Selvíria).

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento dos sistemas de cruzamento e fluxo gênico é de extrema importância para compreender a organização da diversidade genética em populações naturais de plantas. Esses processos promovem a manutenção da variabilidade genética das espécies vegetais, e, portanto, aumentam a adaptabilidade das espécies para futuros problemas ambientais (Kanashiro et al., 2002).

Processos antropogênicos, como a fragmentação florestal e o corte seletivo de árvores, podem afetar o sistema de cruzamento e o fluxo de pólen dentro e entre as populações de plantas, devido ao aumento da distância de coespecíficos e dos cruzamentos correlacionados (Cascante et al., 2002; Fuchs et al., 2003; Smouse & Sork, 2004; Lobo et al., 2005).

Estudos feitos com marcadores moleculares têm revelado que a taxa de cruzamento e as distâncias de dispersão de pólen são sensíveis a mudanças ambientais, mostrando variação em escalas espaciais e temporais, como densidade populacional, abundância de polinizador e sincronia de florescimento (Nason & Hamrick, 1997)

A taxa de cruzamento e a distância de dispersão de pólen podem ser sensíveis a fatores ecológicos e antropogênicos (Ward et al., 2005). Populações tipicamente pouco densas (<1 tree/ha) e com relação mutualística entre árvores e polinizadores animais podem ser susceptíveis à fragmentação de habitat (Dick et al. 2003). Reprodução sexual em populações pouco densas somente pode ocorrer por autofecundação ou longas distâncias de dispersão de pólen (Latouche-Hallé et al., 2004). Se a fragmentação florestal afetar o comportamento do polinizador, reduzindo seu movimento, os efeitos sobre a diversidade genética dessa população podem ser drásticos, como aumento nas taxas de autofecundação e endogamia. Aumento na autofertilização em populações sob

efeito de fragmentação ou corte seletivo de árvores em relação a populações não perturbadas foi reportado para muitas espécies de árvores tropicais (Murawski et al., 1994, Aldrich & Hamrick, 1998, Cascante et al., 2002, Dick et al., 2003, Fuchs et al., 2003, Lobo et al., 2005). Por outro lado, alguns trabalhos não têm reportado diferenças nas taxas de cruzamento e fluxo de pólen, ou têm encontrado aumento na distância de dispersão de pólen em populações antropizadas em relação àquelas conservadas (Dyer & Sork 2001, Dick *et al*. 2003, Sork *et al*. 2005). Isso sugere que processos perturbatórios não afetam o sistema de cruzamento de espécies arbóreas ou favorecem a distância de dispersão de pólen.

A estimativa de distância de dispersão de pólen é importante porque prediz a dinâmica de populações de plantas e é base de estratégias de manejo e conservação de espécies presentes em ambientes altamente impactados (Austerlitz & Smouse, 2001a). O fluxo gênico é o maior responsável pela manutenção dos níveis de diversidade genética encontrada dentro de florestas e determina, também, a estrutura genética da população (Burczyk et al. 2004). O movimento gênico em plantas envolve tanto o fluxo de pólen quanto o de sementes (Sork & Smouse, 2006) e o incentivo a esse fluxo pode reduzir a diferenciação genética, aumentando essa diversidade e o tamanho efetivo das populações.

Dessa forma, o conhecimento do sistema de cruzamento e o movimento efetivo de pólen podem ser cruciais para o sucesso dos programas de conservação e manejo de espécies arbóreas tropicais.

Sob essa perspectiva, novos métodos baseados na análise de paternidade foram propostos para quantificar o fluxo gênico atual, como por exemplo, a análise TWOGENER. A análise de paternidade é um método direto de estudar a dispersão de pólen, na qual permite acessar a árvore doadora de pólen que originou as progênies e

estabelece a distribuição espacial de polinização (Smouse & Sork, 2004). Para esse tipo de análise é necessário fazer um mapeamento completo das árvores reprodutivas em uma área demarcada (Smouse & Sork, 2004). Por outro lado, a análise TWOGENER é um método indireto de estimar o fluxo de pólen, sendo um híbrido dos modelos que utilizam a análise de paternidade e a estrutura genética (Austerlitz & Smouse, 2001). Ela se baseia na heterogeneidade do *pool* gênico do pólen recebido por árvores matrizes espaçadamente localizadas e sobre modelos de dispersão (Smouse & Sork, 2004). O método TWOGENER tem sido usado para estudar os efeitos da fragmentação florestal e corte seletivo de árvores sobre a diversidade genética do pólen em árvores matrizes.

Os marcadores microssatélites são ideais para estas análises de dispersão de pólen em populações de plantas (Dawson et al., 1997), pois essas ferramentas permitem estimar freqüência alélica, possuem alto poder de exclusão de paternidade, com segregação mendeliana e alto polimorfismo (Lian et al., 2001).

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi investigar o sistema de cruzamento e os padrões de dispersão de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo- alba* com o auxílio de marcadores microssatélites.

Os questionamentos dessa etapa do trabalho foram: a) Qual o tipo de sistema reprodutivo da espécie?; b) Quais as taxas de cruzamento entre parentes e correlação de paternidade nas duas populações?; c) Qual a distância de dispersão de pólen nas duas populações? d) Qual o número efetivo de doadores de pólen e o tamanho efetivo da área de polinização nas duas populações?; e) Qual é o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes objetivando a conservação *ex situ*? f) Há diferenças nessas estimativas nas duas populações?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras e análise do DNA

O sistema de cruzamento e o fluxo gênico da espécie florestal *Tabebuia roseo-alba* foram investigados em duas populações distintas: uma localizada em área urbana e fortemente antropizada no campus da USP em Ribeirão Preto – SP e outra presente em uma região de regeneração florestal natural, no município de Selvíria – MS.

Dessa forma, a amostragem feita para os objetivos propostos nesse capítulo foi a mesma descrita nas seções anteriores. Porem foram analisadas somente as matrizes que forneceram sementes: 15 árvores matrizes procedentes de Ribeirão Preto - SP com suas 300 progênies de polinização aberta e 15 árvores matrizes procedentes de Selvíria - MS também com suas respectivas 300 matrizes de polinização aberta.

Para cada árvore matriz da área urbana de Ribeirão Preto foram obtidas sementes procedentes de um a cinco frutos. Já para a população de Selvíria, para cada árvore foram conseguidas progênies de exatos cinco frutos (quatro amostras/fruto/matriz).

O tecido vegetal foliar dessas amostras de ipê branco foi conservado em freezer -20 °C até o momento da extração de DNA [metodologia de Doyle e Doyle (1990), modificada por Alzate-Marin et al. *In press*].

O DNA foi amplificado com oito pares de *primers* microssatélites transferidos de *Tabebuia aurea* (Tau 12, Tau 15, Tau 16 e Tau 19, Tau 21, Tau 22, Tau 29 e Tau 31).

Os protocolos de amplificação, condições de PCR e eletroforese também são iguais aos que já foram expostos no capítulo 1 (subitens 3.5 e 3.6). Resumidamente, para as amplificações de PCR, 2,5ng de DNA genômico foi usado em um volume final

de 10 µL contendo: 0,3 µM de cada *primer*, 1 U *Taq* DNA polimerase, 0,25 mM de cada dNTP, tampão de reação livre de $MgCl_2$ [75 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl e 20 mM $(NH_4)_2SO_4$] e 1,5 mM $MgCl_2$. O programa de PCR usado para a amplificação das regiões microssatélites consistiu de 96°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a *T*a °C (49-56°C) por 1 min, e 72°C por 1 min; seguido por uma extenção final a 72°C por 7 min. Um sistema multiplex com os *primers* Tau 21/ Tau 22 e Tau 15/ Tau 19 foi utilizado. Os produtos de PCR foram desnaturados e separados em géis depoliacrilamida 10%, corados, posteriormente, com nitrato de prata.

2.2. Análises estatísticas

2.2.1. Sistema reprodutivo

As análises foram baseadas nos modelos misto de reprodução (Ritland & Jain 1981) e cruzamentos correlacionados (Ritland 1989) e realizadas através do programa Multilocos MLTR (Ritland 2004) usando o método de máxima verossimilhança (Algoritmo Newton-Rapson). Os parâmetros estimados foram a taxa populacional de cruzamento multiloco (t_m); taxa populacional de cruzamento uniloco (t_s); taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$); correlação de autofecundação (r_s) e correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$). O intervalo de confiança foi obtido por meio de 1000 reamostragens *bootstraps.*

Os parâmetros do sistema de reprodução foram utilizados para gerar outras estimativas demográficas e genéticas. O número efetivo de pais polinizadores ou tamanho da vizinhança reprodutiva foi calculado da correlação de paternidade por

$$\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p .$$

Dos parâmetros do sistema de reprodução foram ainda estimados a proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m \hat{r}_p$) e meios-irmãos ($\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m (1 - \hat{r}_p)$ contidos nas progênies.

O coeficiente de Coancestria (Θ_{xy}) é uma medida do parentesco dos indivíduos dentro das populações, ou seja, é uma quantificação do grau de parentesco entre os indivíduos. Esse coeficiente pode variar de - 1,0 (sem genes em comum) até 1,0 (gêmeos idênticos ou clones).

No presente trabalho calculou-e o coeficiente médio de coancestria (Θ_{xy}) entre plantas dentro de cada progênie através da seguinte expressão,

$$\Theta = 0.125(1 + F_p)[4s(s + t_s) + t_s^2(1 + r_p)] +$$

$$+ 0.25(t_m - t_s)[2(1 + F_p + 2\Theta_p)(s + t_s) + t_s(1 + F_p + 6\Theta_p)(1 - r_p)] +$$

$$+ 0.125(t_m - t_s)^2[(1 + F_p + 6\Theta_p)(1 - r_p) + (1 + F_p + 2\Theta_p)2r_p] \text{(Sebbenn, 2006).}$$

Além disso, obteve-se a estimativa para a média geral do coeficiente de coancestria (Θ_{xy}) dentro de famílias de polinização aberta através da seguinte expressão:

$$\Theta = 0.125(1 + F_p)\{4s[(1 - r_s)(s + t_s) + r_s] + [t_s^2(1 - \hat{r}_s) + t_s r_s](1 + r_p)\} +$$

$$+ 0.25(t_m - t_s)(1 - r_s)[2(1 + F_p + 2\Theta_p)(s + t_s) + t_s(1 + F_p + 6\Theta_p)(1 - r_p)] +$$

$$+ 0.125[(t_m - t_s)^2(1 - r_s) + (t_m - t_s)r_s][(1 + F_p + 6\Theta_p)(1 - r_p) + (1 + F_p + 2\Theta_p)2r_p]$$

(Sebbenn, 2006).

Tal cálculo é feito para espécies bissexuais com variáveis níveis de endogamia ($F_p > 0$), coancestria ($\Theta_p > 0$) e reproduzindo por misturas de autofecundação e

alogamia, cruzamentos correlacionados ($r_p > 0$) e cruzamento entre parentes ($t_m - t_s > 0$) com variação individual na taxa de cruzamento ($r_s > 0$).

O índice de fixação das progênies (F_o) foi partido nos seus componentes devido à autofecundações (F_s) e cruzamento entre parentes ($F_{t_m - t_s}$), $F_o = F_s + F_{t_m - t_s}$, sendo a endogamia advinda de autofecundação (s) estimada por $\hat{F}_s = 0{,}5\hat{s}(1 + \hat{F}_p)$, em que $\hat{F}_p$ é o coeficiente de endogamia na geração parental, e devido à endogamia advinda de cruzamento entre parentes $(1 - s)$ estimada por $\hat{F}_{t_m - t_s} = \hat{\theta}_p$, de forma que, $\hat{F}_o = 0{,}5\hat{s}(1 + \hat{F}_p) + (1 - \hat{s})\hat{\theta}_p$. Assim, de posse de F_o e F_s pode-se estimar $F_{t_m - t_s}$ por $\hat{F}_{t_m - t_s} = \hat{F}_o - \hat{F}_s$, sem pressupor o equilíbrio de endogamia. Em equilíbrio de endogamia o coeficiente de endogamia nas progênies foi estimado por $\hat{F}_o = \hat{s}/(2 - \hat{s})$.

Para conhecer a representatividade genética das progênies foi estimado o tamanho efetivo de variância médio ($N_{e(v)}$), calculado da variância amostral das freqüências alélicas e utilizando uma população idealizada (infinitamente grande e panmítica, sem endogamia, seleção, mutação e migração) como referência, conforme propôs Cockerham (1969),

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0{,}5}{\hat{\Theta}_{xy}}.$$

O número de árvores matrizes para a coleta de sementes foi calculado assumindo que infinitas sementes serão coletadas de cada árvore ($n = \infty$) e que o objetivo é reter na amostra total o tamanho efetivo de referência de 150,

$$\hat{m} = N_{e(referência v)} / \hat{N}_{e(v)} \text{ (Sebbenn, 2003).}$$

Um tamanho de população efetiva de 50 tem sido sugerido como suficiente para manter 90% da variação genética a curtas gerações (10 gerações) em um loco com dois

alelos vindos de uma população idealizada e hipotética (população infinita, com cruzamentos aleatórios, sem endogamia, seleção ou mutação) (Frankel & Soulé, 1981). Porém, as populações naturais de árvores apresentam sobreposição de gerações, muitas vezes autofecundação, estrutura genética espacial e os locos podem ter mais que dois alelos. Tais fatores reduzem a variação genética mais rapidamente que observado por Frankel & Soulé (1981) na população hipotética. Dessa forma, Nunney & Campbell (1993) sugeriram que para propósitos conservacionistas é aconselhável usar um tamanho efetivo populacional de referência de 50 multiplicado até dez vezes, para compensar as possíveis diferenças genéticas e reprodutivas entre as populações naturais e a hipotética usada por Frankel & Soulé (1981) para encontrar esse valor alvo. Então, nesse trabalho foi tomado como referência pra conservação um tamanho efetivo populacional de 150 ($N_{e(reference)}$). Este número representa 150 árvores não parentes e não endogâmicas.

2.2.2. Fluxo de pólen – Análise TWOGENER *(Two-Generation Analysis)*

Foi feita uma análise TWOGENER usando o genótipo de progênies de 30 árvores matrizes (15 de cada população), assim como a posição geográfica de cada árvore-mãe. Duas gerações (pais e filhos) são utilizadas para esse estudo genético. Isso permite a quantificação da heterogeneidade entre os gametas masculinos amostrados pelas árvores maternas em toda a paisagem e a estimativa média da distância de polinização e do tamanho efetivo de vizinhança (Austerlitz & Smouse, 2002).

Usando esse método calculou-se a diferenciação global do *pool* gênico do pólen (Φ_{ft}) entre as árvores matrizes, que é medido em todas as sementes das árvores de uma dada população e é revelada através da análise de amostras de progênies de meios-

irmãos de cada árvore matriz. O programa estima essa diferenciação no *pool* gênico do pólen entre diferentes árvores matrizes usando análise de variância (Amova; Exoffier et al., 1992),

$$\hat{\Phi}_{ft} = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_a^2} \text{ (Smouse et al,. 2001),}$$

Em que σ_a^2 é a variação da freqüência gênica no pólen entre as árvores matrizes e σ_d^2 é a variação da freqüência gênica no pólen dentro de cada árvore matriz. O intervalo de 95 % de confiança entre todas as árvores matrizes Φ_{ft} foi estimado por permutação dos gametas masculinos entre os doadores de sementes (1000 vezes).

O parâmetro Φ_{ft} pode ser superestimado devido à endogamia e autofecundação nas populações parentais. Então, segundo Austerlitz & Smouse (2001b) o parâmetro Φ_{ft} foi corrigido para o coeficiente de endogamia na geração parental (F_p) em que $\hat{\Phi}'_{ft} = \hat{\Phi}_{ft}/(1+\hat{F}_p)$. Já de acordo com Burczyk & Koralewski (2005) o parâmetro Φ_{ft} foi corrigido para a taxa de autofecundação (*s*) em que: $\hat{\Phi}''_{ft} = (2\hat{\Phi}'_{ft} - \hat{s}^2)/2(1-\hat{s})^2$.

Deste modo, ao contrário da análise de paternidade, a genotipagem das putativas árvores paternas não é necessária.

A partir disso foi estimada a distância de dispersão do pólen ($\hat{\delta}$) assumindo uma curva de dispersão normal e exponencial, bem como uma densidade fixa de adultos reprodutivos (*d*) nas populações. Assumindo uma distribuição normal bivariada de dispersão de pólen, a variação do fluxo de pólen (σ^2) foi feita como $\hat{\sigma}^2 = 1/(8\hat{\Phi}''_{ft}\pi d)$ e a média de distância de dispersão de pólen foi computada por $\hat{\delta} = \sqrt{(\pi\hat{\sigma}^2/2)}$ (Austelitz & Smouse, 2001a). Já para o modelo exponencial, a variância de dispersão do pólen (γ^2) foi encontrada pela expressão $\hat{\gamma}^2 = 1/(16\hat{\Phi}''_{ft}\pi d)$ e a distância média de

dispersão do pólen calculada por $\hat{\delta} = 2\hat{\gamma}$ (Austelitz & Smouse, 2001a). O erro foi calculado como um critério quadrático para o ajuste entre os valores esperado e observado de pares das estimativas Φ_{ij} (Austerlitz & Smouse, 2001a). O intervalo de confiança de 99% de Φ_{ft} foi obtido por *bootstrapping* entre progênies com 1000 replicações.

Também do parâmetro Φ''_{ft} estimou-se o número efetivo de doadores de pólen, como $\hat{N}_{ep} = 1/2\hat{\Phi}''_{ft}$ (Smouse et al,. 2001) e a área da vizinhança efetiva de polinização $\hat{A}_{ep} = \hat{N}_{ep} / d$, em que d é a densidade de indivíduos reprodutivos por hectare.

A partir do Φ''_{ft} e da taxa de cruzamento multilocos (t_m) foi estimado o coeficiente médio de coancestria (Θ_{xy}) dentro das famílias usando o método de Ritland (1989):

$$\hat{\Theta}_{xy} = 0.125(1 + \hat{F}_p)[4\hat{s} + \hat{t}_m{}^2(1 + 2\hat{\Phi}_{ft})].$$

De Θ_{xy} foi estimada a média do tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) usando Cockerham (1969), em que uma população idealizada é tomada como referência (tamanho infinito, cruzamentos aleatórios, sem seleção, mutação e migração):

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0.5}{\hat{\Theta}_{xy}}.$$

3. RESULTADOS

3.1. Sistema de cruzamento

Os resultados obtidos das análises do sistema de cruzamento em *T. roseo-alba* nas duas populações estão resumidos na Tabela 11.

As estimativas de taxa de cruzamento multiloco e uniloco foram, respectivamente, 0,840 e 0,473 para as árvores de Ribeirão Preto e 0,963 e 0,566 para as árvores de Selvíria, evidenciando um sistema de reprodução misto (t < 0,95) em *T. roseo-alba,* com predomínio de fecundação cruzada. Nas duas áreas de coleta a taxa de cruzamento uniloco foi menor do que a de cruzamento multiloco, sugerindo ausência de mecanismos de auto-incompatibilidade na espécie.

A diferença entre a taxa de cruzamentos multiloco e uniloco ($t_m - t_s$) tem sido utilizada para quantificar a ocorrência de cruzamentos endogâmicos ou, em outros termos, entre indivíduos aparentados. A diferença da taxa de cruzamento multiloco e uniloco foi positiva e significativa nas populações estudadas, mostrando a ocorrência de 36,8 % e 39,8 % de cruzamento entre indivíduos parentes nas árvores de Ribeirão Preto e Selvíria, respectivamente. O cruzamento entre parentes é a forma de geração de endogamia nas populações de espécies arbóreas, embora seus efeitos sejam mais brandos do que os da autofecundação em si.

As estimativas das taxas de cruzamentos individuais variaram de 0,077 a 0,997 na população de Ribeirão Preto e 0,852 a 0,997 na população de Selvíria (Tabela 12).

A estimativa da correlação de autofecundação (r_s) foi alta e significativa nas populações: média de 0,508 em Ribeirão Preto e 0,068 em Selvíria (Tabela 11).

Os cruzamentos biparentais foram medidos pela correlação de paternidade ($r_{p(m)}$; Ritland, 1989). A correlação $r_{p(m)}$ mede a proporção de indivíduos de

cruzamentos que foram gerados pelas mesmas árvores genitoras, ou irmãos completos (Ritland, 1989). No presente trabalho, a estimativa da correlação de paternidade foi partida em dois componentes: entre progênies de diferentes frutos em uma mesma árvore e entre progênies de um mesmo fruto. Ambas as estimativas foram altas e estatisticamente diferentes de zero nas duas populações (Tabela 11). Os cálculos mostraram que, em média, em um mesmo fruto, 82,4 % e 66,5 % dos cruzamentos são biparentais nas árvores de Ribeirão Preto e Selvíria, respectivamente. Já quando são analisados frutos distintos, apenas 12,2 % e 10,2 % dos cruzamentos em Ribeirão Preto e Selvíria foram geradas pelo mesmo parental materno e paterno.

Uma alta taxa de correlação de paternidade implica que grande parte das progênies seja aparentada no grau de irmãos completos. A taxa de cruzamento multilocos (t_m) obtida para *T. roseo-alba* combinada com a correlação de paternidade nas duas populações permite afirmar que 16 % e 3,7 % das progênies analisadas foram formadas por autofecundação (1- t_m) nas populações de Ribeirão Preto e Selvíria (Tabela 11). Além disso, pode-se afirmar que somente 14,4 % e 32,3 % progênies foram originadas por cruzamentos aleatórios [$P_{MI} = t_m(1 - r_p)$], sendo aparentadas no grau de meio-irmãos e que a grande maioria delas (69,5 % em Ribeirão Preto e 64 % em Selvíria) foram formadas por cruzamentos biparentais, sendo aparentadas no grau de irmãos completos ($P_{IC} = r_p t_m$). Em concordância, o valor estimado para o coeficiente de coancestralidade médio dentro de progênies (Θ_{xy}= 0,374 em Ribeirão Preto e Θ_{xy}= 0,381 em Selvíria) atingiu valor próximo ao esperado por progênies de irmãos completos (0,25). Entretanto, tendo em vista que foram detectados cruzamentos entre indivíduos aparentados, parte das progênies gerada por cruzamentos aleatórios e

biparentais devem ser aparentadas em grau superior ao de irmãos completos, como pode ser verificado na Tabela 12.

A reprodução parcial por autofecundação, associada à correlação de paternidade implica no aumento da coancestria nas progênies e a necessidade de se ter maiores tamanhos amostrais para a conservação *ex situ* do que seria necessário se a população fosse perfeitamente panmítica. Nas populações estudadas, por exemplo, a coancestria das progênies foi maior que a esperada para meios irmãos (0,125) e às vezes até maior que irmãos completos (0,25) e a estimativa do tamanho da variância de uma única progênie foi 1,34 em Ribeirão Preto e 1,31 em Selvíria.

Tabela 11. Estimativa de parâmetros de endogamia, sistema de reprodução e fluxo gênico em *Tabebuia roseo-alba.*

Parâmetro	**Ribeirão Preto**	**Selvíria**
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,840 (0,700 a 0,942)	0,963 (0,934 a 0,987)
Taxa de cruzamento uniloco: t_s	0,473 (0,388 a 0,592)	0,566 (0,529 a 0,654)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	0,368 (0,330 a 0,406)	0,398 (0,333 a 0,405)
Correlação de autofecundação: r_s	0,508 (0,046 a 0,768)	0,068 (-0,200 a 0,200)
Correlação multiloco de paternidade dentro dos frutos: $r_{p(m)d}$	0,824 (0,810 a 0,838)	0,665 (0,650 a 0,680)
Correlação multiloco de paternidade entre frutos: $r_{p(m)e}$	0,122 (0,119 a 0,125)	0,102 (0,099 a 0,105)
Correlação uniloco de paternidade dentro de frutos: $r_{p(s)}$	0,811 (0,512 a 0,999)	0,579 (0,437 a 0,660)
Presença de parentesco entre doadores de pólen: $r_{p(s)}$- $r_{p(m)}$	-0,017 (-0,125 a 0,091)	-0,086 (-0,046 a -0,042)
Número médio de árvores polinizadoras dentro de frutos: $1/r_{p(m)d}$	1,21 (1,09 a 1,63)	1,50 (1,42 a 2,10)
Número médio de árvores polinizadoras entre frutos: $1/r_{p(m)e}$	8,20 (8,0 a 8,4)	9,8 (9,5 a 10,10)
Índice de fixação na população adulta: F_a (n = 34)	0,167 (0,092 a 0,257)	0,277 (0,219 a 0,338)
Índice de fixação nas progênies: F_o	0,381 (0,262 a 0,487)	0,329 (0,200 a 0,487)
Endogamia nas progênies por autofecundação: $F_s = 0{,}5s(1+F_{mat})$	0,093 (0,032 a 0,189)	0,024 (0,008 a 0,044)
Endogamia por cruzamento entre parentes: $F_{t_m - t_s} = F_o - F_s$	0,288 (0,230 a 0,298)	0,305 (0,192 a 0,443)
Proporção de irmãos de autofecundação: $P_{IA} = 1 - t_m$	16,0 (5,8 a 30,0)	3,7 (1,3 a 6,6)
Proporção de meios-irmãos: $P_{MI} = t_m(1 - r_p)$	14,4 (8,1 a 26,9)	32,3 (29,4 a 48,3)
Proporção de irmãos-completos: $P_{IC} = r_p t_m$	69,5 (43,0 a 86,0)	64,0 (45,1 a 69,2)
Coancestria média dentro de progênies: Θ_{xy}	0,374 (0,349 a 0,410)	0,381 (0,265 a 0,489)
Tamanho efetivo de variância: $N_{e(v)}$	1,34 (1,43 a 1,22)	1,31 (1,02 a 1,88)
Número de árvores para reter o tamanho efetivo de 150: m	112 (105 a 123)	114 (80 a 147)

P<0,01. ( ) = intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Tabela 12. Estimativa parâmetros de de coancestria, endogamia, sistema de reprodução e fluxo gênico em duas populações de ipê branco.

Família	**n**	Θ_p	F_a	F_o	t_m	t_s	$t_m - t_s$	$r_{p(m)}$	Θ_{xy}	$N_{e(v)}$
Ribeirão Preto										
1	20	0,026	0,234	0	0,997	0,68	0,317	0,715	0,273	1,76
2	20	0,026	0,251	0	0,997	0,613	0,384	0,951	0,313	1,54
3	20	0,026	0	0	0,903	0,73	0,173	0,821	0,239	1,99
4	20	0,026	0,204	0	0,997	0,815	0,182	0,500	0,232	2,01
5	20	0,026	0	0	0,853	0,534	0,319	0,832	0,248	1,92
6	20	0,026	0,341	0,067	0,077	0,180	-0,103	0,100	0,617	0,81
7	20	0,026	0,057	0	0,755	0,503	0,252	0,341	0,238	1,98
8	20	0,066	0	0,140	0,852	0,677	0,175	0,415	0,216	2,17
9	20	0,026	0,010	0,004	0,900	0,637	0,263	0,735	0,235	2,01
10	20	0,085	0,130	0,113	0,949	0,67	0,279	0,392	0,232	2,04
11	20	0,026	0,136	0,072	0,513	0,397	0,116	0,314	0,329	1,47
12	20	0,018	0	0,020	0,997	0,791	0,206	0,494	0,191	2,42
13	20	0,036	0,061	0,037	0,997	0,728	0,269	0,703	0,236	2,01
14	20	0,026	0	0	0,949	0,67	0,279	0,392	0,190	2,43
15	20	0,026	0,723	0,071	0,513	0,397	0,116	0,314	0,497	1,00
Selvíria										
1	20	0,043	0	0,011	0,949	0,696	0,253	0,561	0,213	2,20
2	20	0,043	0	0	0,997	0,706	0,291	0,454	0,196	2,37
3	20	0,043	0,062	0	0,997	0,808	0,189	0,689	0,233	2,03
4	20	0,043	0,084	0	0,852	0,692	0,16	0,473	0,233	2,03
5	20	0,043	0,367	0	0,852	0,692	0,16	0,473	0,292	1,66
6	20	0,043	0,381	0	0,949	0,575	0,374	0,791	0,328	1,49
7	20	0,043	0,227	0	0,997	0,704	0,293	0,582	0,256	1,86
8	20	0,043	0,429	0	0,948	0,57	0,378	0,552	0,302	1,60
9	20	0,018	0	0,019	0,997	0,634	0,363	0,658	0,214	2,19
10	20	0,135	0	0,136	0,997	0,669	0,328	0,347	0,218	2,13
11	20	0,043	0,087	0	0,997	0,586	0,411	0,449	0,215	2,18
12	20	0,043	0,037	0	0,997	0,69	0,307	0,455	0,203	2,29
13	20	0,043	0	0	0,852	0,581	0,271	0,694	0,239	1,98
14	20	0,051	0,150	0,053	0,997	0,897	0,1	0,305	0,195	2,37
15	20	0,043	0,21	0	0,997	0,547	0,45	0,804	0,289	1,67

n – número de indivíduos

Θ_p - coeficiente de coancestria na geração parental

F_a - endogamia na geração parental

F_o - endogamia na geração de progênies

ts -taxa de cruzamento uniloco;

tm - taxa de cruzamento multiloco

tm-ts - taxa de cruzamento entre parentes

$r_{p(m)}$ - correlação de paternidade

Θ_{xy} - coeficiente de coancestria nas progênies

$N_{e(v)}$ - tamanho efetivo de variância

3.2. Fluxo de pólen – Análise TWOGENER

A diferença no *pool* gênico do pólen das árvores matrizes foi alta nas duas populações ($\hat{\Phi}_{ft}$ Ribeirão Preto = 0,426 e $\hat{\Phi}_{ft}$ Selvíria = 0,326), com um intervalo de confiança de 99% (Tabela 13). A correção de Φ_{ft} para o coeficiente de endogamia na população parental, reduziu esses valores para 0,366 em Ribeirão Preto e 0,255 em Selvíria. Entretanto, a correção de Φ_{ft} para autofecundação aumentou esses valores para 0,499 em Ribeirão Preto e 0,275 em Selvíria. As distâncias médias de dispersão de pólen para os modelos normal e exponencial foram, respectivamente, 35,4m e 39,9 para a população de Ribeirão Preto e 57,3m e 64,6m para a população de Selvíria. A média do número efetivo de doadores de pólen foi extremamente baixa em Ribeirão Preto (1,0) e em Selvíria (1,82). O coeficiente de coancestria estimado dentro das famílias (Θ_{xy}) e o tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) foram muito diferentes do esperado para uma população panmítica ($\Theta_{xy} = 0.125$, $N_{e(v)} = 4$): Θ_{xy} Ribeirão Preto = 0,299; Θ_{xy} Selvíria = 0,253; $N_{e(v)}$ Ribeirão Preto = 1,67; $N_{e(v)}$ Selvíria = 1,98).

Tabela 13. Parâmetros da análise Twogener em uma população urbana de *T. roseo-alba*.

Parâmetro	Ribeirão	Selvíria
Diferenciação do *pool* gênico no pólen: Φ_{ft}	0,426 (0,376 a 0,514)	0,326 (0,238 a 0,486)
Correção para o coeficiente de endogamia: $\hat{\Phi}'_{ft} = \hat{\Phi}_{ft}/(1+\hat{F})$ [a]	0,366 (0,299 a 0,470)	0,255 (0,195 a 0,363)
Correção para o coeficiente de autofecundação: $\hat{\Phi}'_{ft} = (2\hat{\Phi}_{ft} - \hat{s}^2)/2(1-s)^2$ [a]	0,499 (0,335 a 0,862)	0,275 (0,221 a 0,373)
Número médio de doadores de pólen: $\hat{N}_{ep} = 1/2\hat{\Phi}'_{ft}$	1,00 (0,58 a 1,49)	1,82 (1,34 a 2,26)
Coeficiente de coancestria dentro das famílias: $\hat{\Theta}_{xy} = 0.125(1+\hat{F}_p)\left[4\hat{s} + \hat{t}^2(1+2\hat{\Phi}_{ft})\right]$ [c]	0,299 (0,276 a 0,418)	0,253 (0,232 a 0,293)
Tamanho efetivo de variância: $\hat{N}_{e(v)} = 0.5/\hat{\Theta}_{xy}$	1,67 (1,20 a 1,81)	1,98 (1,71 a 2,16)
Área da vizinhança efetiva de polinização: $\hat{A}_{ep} = \hat{N}_{ep}/d$ (ha)	1,00 (0,58 a 1,49)	2,85 (2,46 a 3,11)
Dispersão de pólen para modelo Normal: $\hat{\delta}_{normal}$ (m)	35,4 (26,8 a 43,2)	57,3 (49,2 a 63,8)
Dispersão de pólen para modelo Exponencial: $\hat{\delta}_{exponential}$ (m)	39,9 (30,3 a 48,7)	64,6 (55,5 a 72,0)

( ): $CI_{95\%}$ = Intervalo de confiança para uma probabilidade de erro de 95%; $1.96EP$. *

[a] Correção para endogamia na geração parental (Austerlitz & Smouse, 2001b).

[b] Correção para taxa de autofecundação (Burczyk & Koralewski, 2005).

A:*de*=1árvore/ha.

B: de=0.694 árvores/ha.

4. DISCUSSÃO

4.1. Sistema reprodutivo – taxa de cruzamento e autofecundação

Comparando as estimativas da taxa de cruzamento multiloco com a calculada para a média das espécies arbóreas tropicais (0,880 ± 0,040; Sebbenn, 2001), observa-se que os valores obtidos na população de *T. roseo-alba* são semelhantes.

A taxa de cruzamento em plantas hermafroditas, como *T. roseo-alba*, depende de fatores tais como: presença e intensidade de mecanismos de auto-incompatibilidade; grau de protogenia e protandria; comportamento forrageiro dos polinizadores entre e dentro de árvores, o qual é influenciado pela densidade de florescimento das árvores na população e; aborto seletivo de frutos e sementes de autofecundação (Murawski & Hamrick, 1991).

Estudos sobre sistemas reprodutivos foram realizados em somente 37 das cerca de 800 espécies de Bignoniaceae, sendo que pelo menos 32 (86%) das espécies investigadas são auto-incompatíveis (Bittencourt & Semir, 2005). Dessa forma, esperava-se encontrar alguma evidência de auto-incompatibilidade em *T. roseo-alba,* já que, de acordo com Gribel et al., 1999, a auto-incompatibilidade pode ser filogeneticamente constrita. Ao invés disso, nossos estudos mostraram uma plasticidade no sistema reprodutivo dessa espécie. As estimativas das taxas de cruzamentos individuais mostraram uma tendência de aumento de autofecundação nas árvores isoladas de Ribeirão Preto (Figura 10). Devido a esse fato, a proporção de sementes cruzadas mostrou uma tendência em ser maior nas árvores da população contínua de Selvíria que nas árvores isoladas, mas essa diferença não foi estatisticamente diferente.

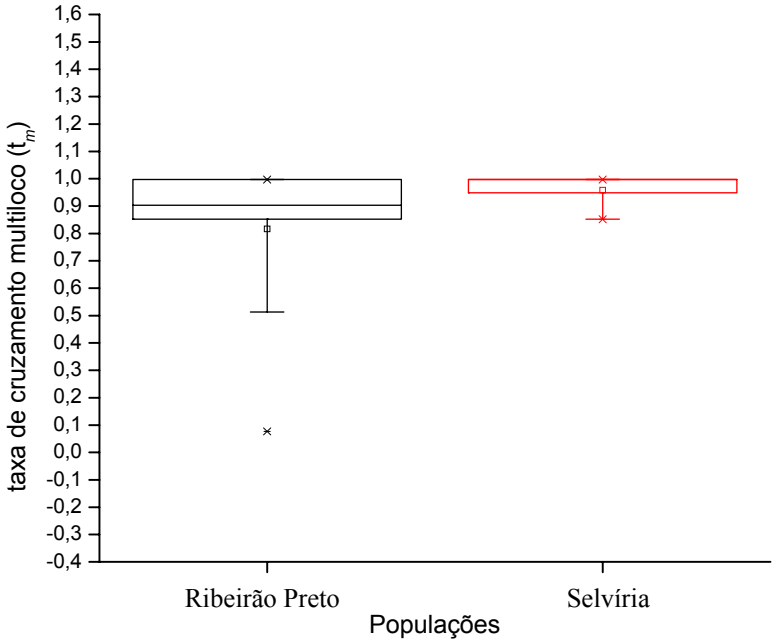

Figura 10. Variação na taxa de cruzamento de *Tabebuia roseo-alba* nas populações de Ribeirão Preto e Selvíria. **outliers*- medidas extremas da taxa de cruzamento.

Em adição, a correlação de paternidade sugeriu que árvores isoladas foram mais passíveis de produzirem sementes de irmãos-completos que os indivíduos da população contínua (Figura 11).

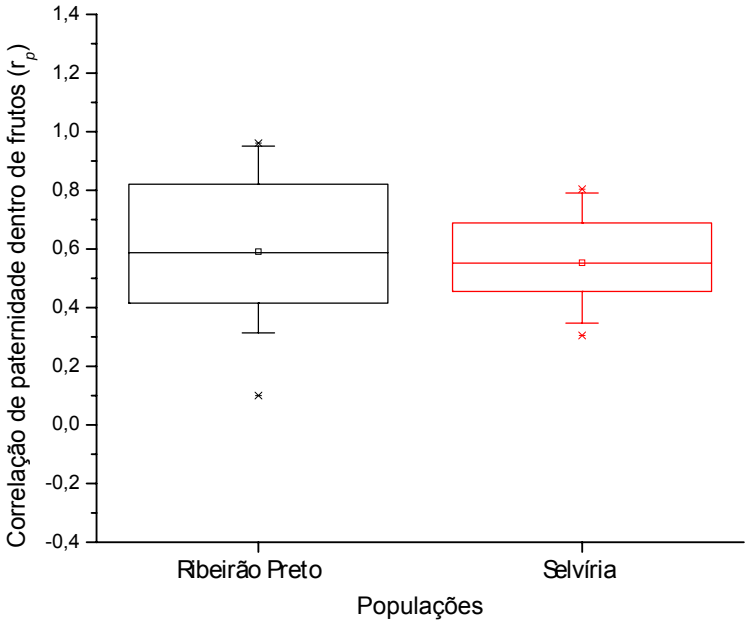

Figura 11. Variação na taxa de correlação de paternidade dentro de frutos em *Tabebuia roseo-alba* nas populações de Ribeirão Preto e Selvíria. **outliers*- medidas extremas de correlação de paternidade.

Por último, a correlação de autofecundação mostrou uma maior variação na taxa de cruzamento nas árvores isoladas de Ribeirão Preto que em Selvíria (Figura 12). Embora nenhuma dessas estimativas tenha sido estatisticamente diferente nos dois conjuntos amostrais, a análise dos gráficos deixa evidente uma maior variação das taxas de cruzamento, correlação de paternidade e correlação de autofecundação em Ribeirão Preto, que apresentou valores mais extremos. Análises de sistema de cruzamento têm mostrado um potencial para variação de taxas relativas de autofecundação e fecundação cruzada entre indivíduos dentro de populações, entre populações e entre diferentes eventos de florescimento (Murawski & Hamrick, 1991).

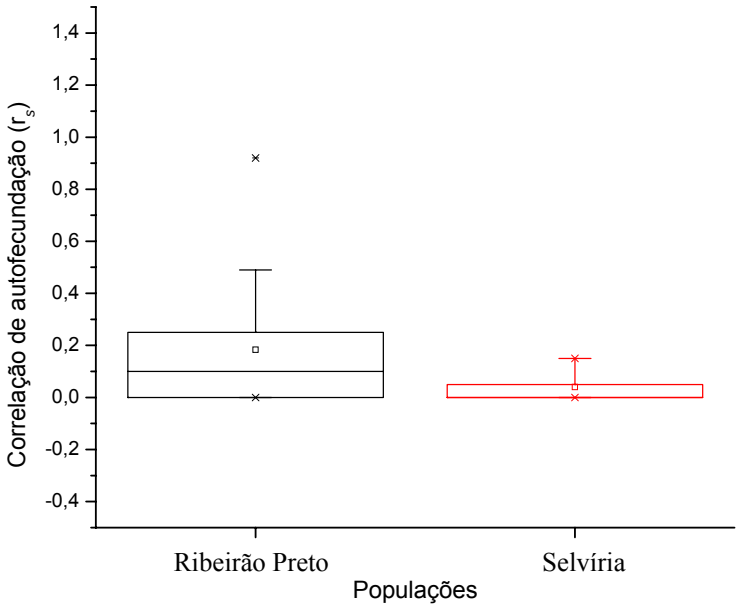

Figura 12. Variação na taxa de correlação de auto-fecundação de *Tabebuia roseo-alba* nas populações de Ribeirão Preto e Selvíria. **outliers*- medidas extremas da taxa de correlação de auto-fecundação.

Trabalhos indicam que a plasticidade no sistema reprodutivo e *fitness* de plantas podem ocorrer em resposta a mudanças de polinizador: ausência ou diminuição do polinizador muda o sistema reprodutivo de determinadas espécies de plantas a favor da autofertilização (Lobo, 2005). O movimento do polinizador pode também ser afetado pela mudança do habitat, conseqüentemente afetando o sistema reprodutivo de determinada espécie de planta. Nas populações de ipê branco analisadas, observou-se uma variação tanto intrapopulacional, especialmente nas árvores de Ribeirão Preto, cuja taxa de cruzamento variou desde a completa autofecundação até a alogamia, quanto entre as populações, já que houve uma maior correlação de autofecundação nas árvores isoladas que nas da população de Selvíria.

A variação individual intrapopulacional na taxa de cruzamento já foi relatada por Murawski & Hamrick (1992) em *C. pentandra* (Malvaceae), que variou da completa autofecundação até a alogamia; por (Lemes 2000, *apud* Ward et al., 2005) em *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) e por Latouche-Halle´ et al. (2004) em *D. guianensis* (Fabaceae).

Por outro lado, diferenças interpopulacionais nas características do sistema reprodutivo têm sido observadas para diferentes espécies de plantas. Mudanças na paisagem, tais como corte seletivo de espécies arbóreas, desflorestamento e destruição de habitat alteram a densidade populacional, estrutura demográfica, fenologia, diversidade e comportamento do polinizador, implicando em mudanças no sistema reprodutivo de certas espécies (Lowe et al., 2005).

Essa plasticidade do sistema de cruzamento em diferentes populações já foi constatada em outras espécies. Por exemplo, em um estudo conduzido com a espécie arbórea tropical *Paquira quinata* na Costa Rica, foram detectadas taxas de autofecundação de 8,5% e correlação de paternidade de 47% em florestas contínuas e 22,3% e 74%, respectivamente em árvores isoladas em pastagens (Fuchs et al., 2003). Resultados semelhantes foram observados na espécie arbórea tropical *Samanae saman* (Cascante et al., 2002).

Estudos de sistema de cruzamento e mecanismos de auto-incompatibilidade da família Bombacaceae sugerem que estimativas populacionais da taxa de cruzamento podem ser influenciadas por diferentes condições de densidade (Fuchs et al., 2003). *P. quinata,* por exemplo, em estudos de populações naturais contínuas parecia ser auto-incompatível (Quesada et al., 2001). Mas resultados de análises genéticas em árvores de diferentes níveis de isolamento sugere que parcial auto-compatibilidade depende do grau de isolamento (Fuchs et al., 2003). O autor sugere como possível explicação dos resultados a possibilidade de que

P. quinata tenha um sistema crítico de auto – incompatibilidade que permite autofecundação quando o conjunto de pólen cruzado compatível é limitado.

As causas para esse fenômeno são explicadas por estudos genéticos que indicam que populações fragmentadas ou árvores isoladas são mais susceptíveis a produzirem sementes de autofecundação ou terem poucos doadores de pólen (Cascante et al., 2002; Fuchs et al., 2003; Lobo et al., 2005).

Em adição ao isolamento espacial causado pela fragmentação, o isolamento temporal causado pelo assincronismo do florescimento dos indivíduos tem sido proposto como outro importante fator que afeta a reprodução e a estrutura genética em plantas de ambientes perturbados (Murawski & Hamrick, 1991; Murawski & Hamrick, 1992; Fuchs et al., 2003). O acompanhamento do florescimento das matrizes utilizadas nesse trabalho permite afirmar que as árvores isoladas de Ribeirão Preto tiveram um assincronismo muito maior que aquelas de Selvíria.

Sendo assim, apenas estudos futuros que conciliem informações sobre florescimento, comportamento do polinizador e dados de sistema reprodutivo poderão afirmar conclusivamente as causas dessa plasticidade do sistema de cruzamento do ipê branco.

4.2. Sistema reprodutivo – taxa de cruzamento entre parentes e endogamia

Um alto e significativo coeficiente de endogamia foi detectado nas gerações de adultos e progênies nos dois conjuntos amostrais (Tabela 11). Ambas, autofecundação e cruzamento entre parentes geram endogamia, embora o cruzamento entre parentes gere uma taxa muito menor do que a autofecundação. A autofecundação pode gerar, no mínimo, 50% de endogamia a cada geração ($F = 0{,}5s(1 + F_p)$, em que, F e F_p são a endogamia nas progênies e na população parental e s é taxa de autofecundação), enquanto que o cruzamento entre

parentes gera endogamia em uma taxa de igual ao coeficiente de coancestria na geração parental.

Nas populações de ipê branco estudadas, a autofecundação é uma das causas dessa alta endogamia, mas não pode explicar totalmente os valores observados. Por exemplo, as taxas de autofecundação encontradas nas populações podem produzir um coeficiente de endogamia de 0,093 em Ribeirão Preto e 0,024 em Selvíria. Assim, o cruzamento entre parentes é a principal causa dessa endogamia, sendo responsável por 75,6% e 92,7% da endogamia em Ribeirão Preto e Selvíria, respectivamente. A estimativa de diferença entre a taxa de cruzamentos multiloco e uniloco ($t_m - t_s$) tem sido utilizada para quantificar a ocorrência de cruzamentos endogâmicos ou, em outros termos, entre indivíduos aparentados. De fato foi observado que parte dos cruzamentos ocorridos nas populações foram entre árvores aparentadas. Assim, o nível médio de endogamia observada nas populações estudadas poderia ter sido gerado pelo cruzamento entre irmãos-completos ($\theta_{xy} = 0{,}25$).

Este resultado também sugere que a população parental de ambas as localidades (Ribeirão Preto e Selvíria), na qual as sementes foram obtidas, provavelmente apresenta estrutura genética espacial. A dispersão de sementes a curtas distâncias tem sido considerada como a principal causa da estrutura genética espacial em diversos estudos realizados em espécies arbóreas (Degen et al., 2004; Carneiro et al., 2007; Lacerda et al., 2008; Silva et al., 2008; Bittencourt & Sebbenn, 2007; 2008). Além disso, o comportamento do polinizador pode aumentar esse cruzamento preferencial: espécies forrageando flores de árvores próximas aumentam a probabilidade de cruzamentos biparentais. Esse último fator é especialmente importante para espécies como o ipê branco, cujas flores abrem-se simultaneamente em uma mesma árvore e permanecem viáveis por no máximo 3 dias.

Para ambas as populações (contínua e isolada) a endogamia foi maior na geração de progênies em comparação a geração parental. Contudo constatou-se que o aumento nos níveis de endogamia na geração de progênies para a população de árvores isoladas (Ribeirão Preto) foi mais pronunciado que na população contínua (Selvíria). Jump & Peñuelas (2006) observaram na regeneração de fragmentos de *Fraxinus exselsa* um aumento nos níveis de endogamia em comparação a geração adulta, demonstrando claramente os efeitos da fragmentação afetando as gerações subseqüentes pelo processo de deriva genética.

Outras explicações para o alto índice de fixação detectado são a presença de alelos nulos e o efeito Wahlund. Esse último provoca o aumento de endogamia devido ao fato de as amostras coletadas serem muito distantes (no caso das amostras de Ribeirão Preto) e, possivelmente, representarem subpopulações de uma população.

4.3. Cruzamentos correlacionados

As estimativas das correlações de autofecundação (r_s), ou a probabilidade de encontrar um indivíduo gerado por autofecundação onde foi encontrado outro de autofecundação foram muito diferentes nas duas populações (Figura 11) e diferiram estatisticamente entre si. Em Ribeirão Preto essa estimativa foi muito mais alta (0,508) que em Selvíria (0,068). Isso mostra uma forte tendência de algumas árvores maternas deixarem mais descendentes por autofecundação que outras, reforçando a conclusão de que a espécie possui uma plasticidade no sistema reprodutivo, estando as árvores isoladas mais susceptíveis à autofecundação que aquelas presentes na floresta contínua.

A correlação de paternidade mede a proporção de indivíduos de cruzamentos que foram gerados por cruzamentos biparentais (Ritland, 1989). No presente trabalho essa estimativa foi partida em dois componentes: a correlação de paternidade entre sementes de

uma mesma síliqua ($r_{p(s)}$) e a correlação de paternidade entre sementes de diferentes frutos de uma mesma árvore ($r_{p(m)e}$).

A estimativa $r_{p(s)}$ em *T. roseo-alba* foi elevada e significativamente diferente de zero nas duas populações (0,824 em Ribeirão Preto e 0,665 em Selvíria). Também verificou que elas não diferenciam entre si, embora haja uma tendência desta estimativa ser maior nas árvores isoladas de Ribeirão Preto (Figura 13). Esses resultados apontam que parte das progênies de cruzamentos foi gerada pelo mesmo parental materno e paterno e que as progênies não são compostas exclusivamente por meios-irmãos, mas por uma mistura de meios-irmãos, irmãos completos e irmãos de autofecundação. Em outra espécie do mesmo gênero, *Tabebuia cassinoides* (Sebbenn et al., 2001) também foi detectada grande correlação de paternidade (0,547).

Os resultados de correlação de paternidade em diferentes níveis hierárquicos mostraram que existe uma maior probabilidade de sementes compartilharem o mesmo parental dentro de um mesmo fruto que entre frutos de uma mesma árvore.

As causas desses cruzamentos correlacionados podem ser atribuídas ao comportamento dos polinizadores visitando de forma sistemática árvores próximas, poliandria ou depósito de múltiplos grãos de pólen de um simples polinizador e pequeno número de vizinhos próximos (Sun & Ritland, 1998) ou assincronismo no florescimento das árvores. Possivelmente vários destes fatores tenham contribuído para a alta taxa de cruzamento biparental observadas em *T. roseo-alba*.

Ortolani, 2007 estudando os grãos de pólen de ipê branco classificou-os como grãos simétricos, isopolares bilaterais, elipsóides e tricolpados. Dessa forma, provavelmente eles não sejam dispersos como polínios. Assim, o comportamento do polinizador, somado ao

assincronismo e rápido florescimento dá espécie devem ser as principais causas desses cruzamentos correlacionados.

Fuchs et al., (2003) também observou que as árvores isoladas em pastagens têm uma correlação de paternidade mais elevada (0,74) do que árvores situadas nas florestas naturais (0,47), atribuindo este resultado à baixa densidade de árvores reprodutivas presentes em ambientes deturpados.

4.4. Número efetivo de doadores de pólen

A partir da correlação de paternidade é possível estimar o número de indivíduos polinizadores efetivos por árvore ($1/r_{p(m)e}$) e por fruto ($1/r_{p(m)d}$). Estes valores indicam a média do número de indivíduos que contribuíram com pólen no evento de reprodução de uma árvore materna e de um único fruto dessa árvore.

O número de árvores polinizadoras de um único fruto foi extremamente baixo, não chegando a dois em nenhuma das duas populações de ipê branco estudadas (1,21 em Ribeirão Preto e 1,5 em Selvíria). Este valor reforça a idéia de um comportamento sistemático do polinizador que deposita grande quantidade de pólen (derivado de uma árvore doadora) em uma única flor resultando em muitos irmãos completos no fruto. Por outro lado, o número de árvores polinizadoras de uma árvore matriz foi maior (8,2 em Ribeirão Preto e 9,8 em Selvíria).

Esses valores são comparáveis aos encontrados em outras espécies florestais, com 2 a 7 doadores de pólen (James et al., 1998; Rocha & Aguilar 2001; Dunphy et al., 2004; Azevedo et al., 2007; Carneiro et al., 2007).

Assim, o número de doadores de pólen observado em *T. roseo-alba* está dentro do padrão observado em outras espécies tropicais, sugerindo que espécies tropicais são

efetivamente polinizadas por um baixo número de doadores de pólen contribuindo para a existência de irmãos-completos em famílias de polinização aberta.

4.5. Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo de variância

Em concordância com as estimativas da correlação de paternidade, o valor estimado para o coeficiente de coancestria dentro de progênies nas duas populações indica a presença de misturas de parentescos.

A reprodução parcial por autofecundação, associada à correlação de paternidade implica no aumento da coancestria nas progênies e a necessidade de se ter maiores tamanhos amostrais para a conservação *ex situ* do que seria necessário se a população fosse perfeitamente panmítica. Nas populações estudadas, por exemplo, as coancestrias das progênies foram quase o triplo (0,374 em Ribeirão Preto e 0,381 em Selvíria) daquela esperada para meio irmãos (0,125) e não diferiram estatisticamente entre si.

A partir da coancestria calculou-se o tamanho efetivo da variância de uma única progênie: 1,34 em Ribeirão Preto e 1,31 em Selvíria. Em uma progênie de tamanho infinito advinda de uma população panmítica, o tamanho efetivo de variância é, no máximo, 4. Assim, nas amostras estudadas, o tamanho efetivo alcançado foi cerca de 67% menor que o esperado para uma população perfeita. Em termos práticos, isso significa que se tiver a intenção de reter um tamanho efetivo de 150 em uma população, é necessário coletar sementes de pelo menos 112 e 114 árvores de ipê branco da população de Ribeirão Preto e Selvíria respectivamente, a fim de garantir uma variabilidade genética suficiente para a manutenção da população a ser implantada.

4.6. Análise TWOGENER

4.6.1. Diferenciação do *pool* gênico do pólen

Os resultados mostraram uma elevada diferenciação genética no conjunto gênico dos grãos de pólen das árvores matrizes amostradas, sendo que o valor encontrado para as árvores isoladas em Ribeirão Preto (0,499) foi visivelmente maior que aquele encontrado para as matrizes de Selvíria (0,275). Isso confirma a hipótese de que a heterogeneidade do *pool* gênico dos grãos de pólen entre árvores isoladas e distantes é maior que aquela presente em matrizes de áreas contínuas naturais. Muitos fatores podem levar ao aumento dessa estimativa em ambientes fragmentados.

Primeiramente, a baixa densidade de árvores reprodutivas causada pela fragmentação florestal isola coespecíficos e pode alterar o sistema de cruzamento e o comportamento do polinizador de espécies polinizadas por animais (Cascante et al., 2002; Fuchs et al., 2003).

Também o assincronismo do florescimento pode reduzir o número efetivo de doadores de pólen, restringindo o conjunto gênico de pólen disponível, o que acarreta em um aumento da diferenciação entre árvores matrizes distantes. Finalmente, a autofertilização pode também promover esse aumento por elevar a diferenciação do *pool* gênico do pólen devido ao predomínio de genes maternos nas progênies (Murawski & Hamrick, 1991).

A elevada taxa de endogamia encontrada na população de Ribeirão Preto, somada ao isolamento das árvores e o assincronismo do florescimento (observação pessoal) contribuíram para esse aumento na taxa de diferenciação gênica do pólen nessa população.

Os valores de Φ_{ft} encontrados nas duas populações de ipê branco foram maiores que valores reportados em outras espécies arbóreas polinizadas por animais (*Dizinia excelsa*: $\hat{\Phi}_{ft} = 0{,}104$, Dick et al., 2003; *Symphonia globulifera*: $\hat{\Phi}_{ft} = 0.205$, Degen *et al.*, 2004; *Cornus florida*: $\hat{\Phi}_{ft} = 0{,}174$, Sork, et al., 2005).

A partir do valor de Φ_{ft} foi possível calcular o número médio de doadores de pólen $\hat{N}_{ep}$ (1,00 em Ribeirão Preto e 1,82 em Selvíria), o coeficiente de coancestria $\hat{\Theta}_{xy}$ (0,299 em Ribeirão Preto e 0,253 em Selvíria) e o tamanho efetivo de variância $\hat{N}_{e(v)}$ (1,67 em Ribeirão Preto e 1,98 em Selvíria). Nota-se que todas as estimativas foram ligeiramente menores que àquelas obtidas pelo método de correlação de paternidade. Porém todos os índices mantiveram o padrão de diferenciação entre as duas populações reforçando as hipóteses de alterações do sistema de cruzamento e fluxo de pólen em árvores isoladas provenientes de ambientes deturpados.

Tais diferenças dos valores encontrados para os dois métodos são conseqüências de diferenças matemáticas no modo de estimar cada parâmetro. Além disso, a coancestria calculada nos subitens anteriores possui uma correção para a autofecundação (Sebbenn, 2006), elevando o valor do parentesco e das demais estimativas associadas. Como a espécie estudada possui sistema misto de reprodução, sugere-se que os valores obtidos anteriormente sejam mais robustos.

4.6.2. Distância média de dispersão do pólen

As distâncias médias de dispersão de pólen (δ) observadas em ipê branco nas populações de Ribeirão Preto e Selvíria variaram, respectivamente, de 26,8 m a 48,7 m e de 49,2 m a 72 m para o modelo normal e exponencial.

Alguns estudos sugerem que o fluxo de pólen obtido pela análise TWOGENER seja restrito (Dyer & Sork, 2001; Smouse et al., 2001; Smouse & Sork 2004) enquanto que aquele conseguido pela análise de paternidade ocorra em grandes distâncias (Smouse & Sork, 2004). Estas diferenças podem ser conseqüência de disparidades nas populações estudadas, nos parâmetros assumidos e contrastes estatísticos (Smouse & Sork, 2004). Assim, podemos

sugerir que talvez o fluxo de pólen encontrado nas populações de ipê branco tenha sido subestimado. Contudo, apenas uma comparação entre os dois métodos pode afirmar, com certeza, se há variação nas estimativas.

Esses valores foram, também, baixos quando comparados a distância média de dispersão de pólen de outras espécies arbóreas pelo mesmo método (64,8 m em *Quercus lobata,* Sork et al. (2002); 1509 m em *Dinizia excelsa,* Dick et al. (2003)*;* 65-89m em *Sextonia rubra,* Veron et al. (2005); 101 - 444 m em *Symphonia globulifera,* Carneiro et al. (2007).

Trabalhos recentes têm relatado um aumento da distância média de dispersão de pólen em espécies arbóreas submetidas à fragmentação. Por exemplo, Dick et al. (2003) encontrou pela análise TWOGENER uma média de distância de dispersão de pólen de 1509 m para *Dinizia excelsa* em uma população fragmentada e 212 m de distância de dispersão para a mesma espécie em uma população contínua. Porém, no presente trabalho esse padrão não foi observado. Houve um aumento na distância de dispersão de pólen na paisagem contínua. Provavelmente o assincronismo de florescimento e alteração no comportamento ou até no tipo de polinizador podem ter causado essa diferença. De qualquer maneira, estudos fenológicos são requeridos para um completo entendimento do fenômeno.

4.7. Implicações dos resultados para a conservação da espécie

Em programas de restauração florestal, endogamia, cruzamentos correlacionados, autofecundação e estrutura genética espacial são fatores chave na tomada de decisões para a coleta de sementes e o plantio das mudas.

No presente trabalho nossos resultados mostraram que *T. roseo alba* possui um sistema misto de reprodução, com elevada correlação de paternidade e cruzamento entre

parentes e baixo número de doadores de pólen. Tudo isso implica em um aumento da coancestria e uma diminuição do tamanho efetivo de variância. Sendo assim, sementes para a conservação genética, testes de progênies e reflorestamento devem ser coletadas de um elevado número de árvores matrizes ($\hat{m}Ribeirão\,\mathrm{Pr}eto = 112$ e $\hat{m}Selvíria = 114$) para reter um tamanho efetivo populacional de 150.

Além disso, a pequena distância de fluxo gênico obtida sugere que fragmentação ou corte seletivo de árvores pode isolar reprodutivamente as árvores de ipê branco. Isso implicaria, como descrito para as árvores isoladas de Ribeirão Preto, em um aumento da taxa de autofecundação e cruzamentos correlacionados, aumentando a diferenciação genética do grão de pólen.

Também a alta correlação de paternidade encontrada em cada um dos frutos das árvores matrizes mostra que embora cada fruto produza uma grande quantidade de sementes (um quilograma de cápsulas de ipê branco contém aproximadamente 71.000 sementes, ou seja, cada cápsula contém aproximadamente 200 sementes) o ideal é que sejam coletados vários frutos por matriz e poucas sementes por fruto, a fim de aumentar a variabilidade genética.

O elevado coeficiente de coancestria sugere que as populações de ipê branco possuam estruturação espacial. Enquanto tal hipótese não é testada, sugere-se que árvores matrizes para a coleta de sementes sejam escolhidas espaçadamente, seja na floresta contínua ou no ambiente fragmentado, evitando redundância genética nas progênies.

5. CONCLUSÕES

Com base nas análises realizadas concluímos que:

1. A espécie apresentou um sistema de reprodução misto com predomínio de fecundação cruzada;

2. Foi evidenciada uma plasticidade no sistema reprodutivo dessa espécie, sendo que as estimativas das taxas de cruzamentos individuais mostraram uma tendência de aumento de autofecundação nas árvores isoladas de Ribeirão Preto;

3. As populações possuem alto e significativo coeficiente de endogamia sendo o cruzamento entre parentes a principal causa dessa endogamia;

4. As estimativas da correlação de paternidade (partida em dois componentes: entre progênies de diferentes frutos em uma mesma árvore e entre progênies de um mesmo fruto) foram altas e estatisticamente diferentes de zero nas duas populações;

5. Além disso, tais correlações de paternidade sugeriram que árvores isoladas foram mais passíveis de produzirem sementes de irmãos-completos que os indivíduos da população contínua;

6. A grande maioria (69,5 % em Ribeirão Preto e 64 % em Selvíria) das progênies foram originadas por cruzamentos biparentais, sendo aparentadas no grau de irmãos completos;

7. O valor estimado para o coeficiente de coancestralidade médio dentro de progênies (Θ_{xy} = 0,374 em Ribeirão Preto e Θ_{xy} = 0,381 em Selvíria) atingiu valor próximo ao esperado por progênies de irmãos completos (0,25), sugerindo estruturação populacional;

8. O tamanho efetivo da variância de uma única progênie foi baixo nas duas populações (cerca de 67% menor que o esperado para uma população perfeita);

9. A diferença no *pool* gênico do pólen das árvores matrizes foi alta nas duas populações;

10. A distância de dispersão de pólen foi baixa nas duas populações tendendo ser maior na população contínua de ipê branco;

11. Com a intenção de reter um tamanho efetivo de 150 nessas populações, é necessário coletar sementes de pelo menos 112 e 114 árvores de ipê branco da população de Ribeirão Preto e Selvíria respectivamente.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH, P. R.; J. L. HAMRICK. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. **Scien.** 281: 103-105. 1998.

ALLCOCK, A.L.; CHAUVET, M.; CRANDALL, K.A.; GIVEN, D.R.; HALL, S.J.G.; IRIONDO, J.M.; LEWINSOHN, T.M.; LYNCH, S.M. SOLÉ-CAVA, A.M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A.R.; WATTS, P.C. **Genetic diversity as a component of biodivrsity.** In: Heywood, V.H.; Watson, R.T. (eds). Global Biodiversity Assessment. Cambridge: Cambridge University Press, p.57-88. 1995.

ALVES, R. M. Caracterização genética de populações de cupuazeiro, *Theobroma grandiflorium* (Willd. Ex. Spreng) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos. ESALQ, 2002. 146p. Tese (Doutorado) – Departamento de Genética, ESALQ, Piracicaba, 2002.

ALZATE-MARIN, A.L.; GUIDUGLI, M.; SORIANI, HH; MARTINEZ, C.A.H.; MESTRINER, MA. An Efficient and rapid DNA minipreparation suitable for PCR/SSR and RAPD analysis in tropical Forest tree species. **Brasil. Arch. Biol**. *In press.*

ANGOLD, P.G.; SADLER, J.P.; HILL, M.O.; PULLIN, A.; RUSHTON, S.; AUSTIN, K.; SMALL, E.; WOOD, B.; WADSWORTH, R.; SANDERSON, R.; THOMPSON, K. Biodiversity in urban habitat patches. **Sci. Total Envir.** 360: 196– 204. 2006.

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P.E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φ_{ft}, pollen dispersal and inter-female distance. **Genet.** 157: 851-857. 2001a.

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P.E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. III. Impact of adult population structure. **Genet. Res.** 78: 271-280. 2001b.

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P.E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. IV. Estimating the dispersal parameters. **Genet.** 161: 355-363. 2002.

AZEVEDO, V.C.R.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A.Chev., a heavily logged Amazonian timber species. **J. Heredity.** 2007. *(in press)*

BARBOSA, L.M.. Diretrizes da secretaria de estado do meio ambiente de São Paulo para reflorestamento heterogêneo de áreas degradas. CINP-SMA – São Paulo. 2002. Disponível em : <http:www.rc.unesp.Br/xivsbsp/Mesa03MLMB.PDF>

BITTENCOURT JÚNIOR, N.S.; SEMIR, J. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **Int. J. of Plant Sciences** 166:493-506. 2005.

BITTENCOURT, J.M. Genetic Diversity and Dynamics in Remnant Patches of *Araucaria angustifolia* Forest in Paraná State, Brazil; Implications for Conservation and Restoration. PhD Thesis. University of Reading. 228p. 2007.

BITTENCOURT; J.M., SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Hered.** 99: 580-591, 2007.

BITTENCOURT; J.M., SEBBENN, A.M. Pollen movement in a continuous forest of *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TwoGener analysis. **Conserv. Genet.** DOI: 10.1007/s10592-007-9411-2, 2008.

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). **Mol. Ecol. Notes.** 7: 53-56. 2006.

BRONDANI, R. P. V.; GAIOTO, F.A.; MISSIAGGIA, A.A.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Mol. Ecol. Notes.** 3: 177-179, 2003.

BURCZYK, J.; KORALEWSKI, T.E. Parentage versus two-generation analysis for estimating pollen-mediated gene flow in plant population. **Mol. Ecol.** 14: 2525-2537. 2005.

BURCZYK, J.; LEWANDOWSKI, A.; CHALUPKA, W. Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). **Forest Ecology and Management**, 197, 39-48, 2004.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Circular Técnica, 20, p.1-11. 2003.

CARNEIRO, F.; SEBBENN, A.M.; KANASHIRO, M.; DEGEN, B. Low inter-annual variation of mating system and gene flow of *Symphonia globulifera* in the Brazilian Amazon. **Biotropica** 39:628-636. 2007.

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*. **Conserv. Biol.** 16: 137-147. 2002.

CENIS, J.L. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. **Terral.** 12: 40-43. Disponível em: http://www.terralia.com/revista12/pagina40.htm.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microssatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. Am. J. Bot. v.83, p.51-57, 1996.

CHEPTOU, P.O.; AVENDAÑO, L.G. Pollination processes and the allee effect in highly fragmented populations: consequences for the mating system in urban environments. **New Phytologist**, 172: 774–783. 2006

CIAMPI, A.Y. et al. Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorfii* Desf. (Copaíba) Leguminosae-Caesalpinoideae. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 2000. 40p.

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

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evol.** 23: 72-84, 1969.

COLES, J.F.; FOWLER, D.P. Inbreeding in neighboring trees in two White Spruce populations. **Silv. Genetic.** 25: 29-34, 1976.

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

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. Mol. Ecol. 10: 349 - 356, 2001.

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

DAWSON, I. K.; WAUGH, R.; SIMONS, A. J.; POWELL, W. Simple sequence repeats provide a dirrect estmates of pollen-mediated gene dispersal in tropical tree *Gliricidia sepium*. **Mol. Ecol.** 6: 179-183, 1997.

DAYANANDAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). **Am. J. Bot.** 84: 1658-1663, 1997.

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

DECROOCQ, V.; FAVE, M. G.; HAGEN, L.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. **Theor Appl Genet**. 106: 912 – 922, 2003.

DEGEN, B. Genetic data analysis and numerical test. GDA-NT. Beta version 1.0. 2006.

DEGEN, B., BANDOU, E.; CARON, H. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French **Guiana. Heredity**. 93: 585-591, 2004.

DEMATTÊ, J.L.I. Levantamento detalhado dos solos do campus experimental de Ilha Solteira. Piracicaba: ESALQ/USP, 1980. 131 p.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Variação genetic em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. **Agrotrópica** 3:119-127, 1991.

DICK, C.W. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. **Proc Roy Soc Lond B.** 268: 2391–2396, 2001.

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

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

DUNPHY, B.K.; HAMRICK, J.L.; SCHWAGERL, J. A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest life zone of southwestern Puerto Rico. **Int. J. Plant Sci**. 165:427-436, 2004.

DYERS, R. J., K.; SORK, V. L. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine *Pinus echinata* Mill. **Mol. Ecol**. 10: 859-866, 2001.

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

ELLSTRAND, N. C.; ELLAN, D. R. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 24: 217 - 242, 1993.

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

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. W. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491, 1992.

FAO'S REPORT. Global forest resources assessment 2000, tropical South America. **FAO Forestry Paper**, 140: 287 - 291, 2001.

FERES, J.M.; MARTINEZ, M.L.L.M.; MARTINEZ, C.A.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba.* **Mol Ecol Notes.** 2008. *In press.*

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

FERRETTI, A. R. et al. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecofisiológicos para revegetação com nativas no estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, 3: 73-77, 1995.

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

FONSECA, S.M. Variações fenotípicas e genéticas em bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). ESALQ, 1982. 86p. Tese (Mestrado) – Departamento de Ciências Florestais. Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba, 1982.

FRANKEL, O.H.; SOULE, M.E. Conservation e Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1981.

FREELAND, J. R. Molecular ecology. Sussex, Wiley. 2005.

FREITAS, L.B.; BERED, F. Genética e Evolução Vegetal. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. 463p.

FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; 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** 17: 149-157, 2003.

FUTUYMA, D. J. Biologia evolutiva. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 631 p.

GASTON, K.J.; SMITH, R.M.; THOMPSON, K.; WARREN, P.H. Urban domestic gardens (II): experimental tests of methods for increasing biodiversity. **Biodivers Conserv** 14:395– 413, 2005.

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

GENTRY, A. H. A Synopsis of Bignoniaceae Ethnobotany and Economic Botany . **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 79: 53-64, 1992.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity** 63: 135-141, 1989.

GOUDET, J. Fstat. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. **J. Heredity**, 86: 485-486, 2002.

GRIBEL, R.; GIBBS, P.E.; QUEIRO´Z, A.L. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. **J Trop Ecol.** 15: 247– 263, 1999.

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

GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Curr Sei.** 70: 45 – 54, 1996.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica.** 113: 163 -185, 2000.

HAMILTON, M.B. Tropical tree gene flow and seed dispersal. **Nature**, 401:129-30, 1999.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI 1.1. A program for spatial pattern analysis of genetic diversity. Version for Windows 95. Disponível em: <http://www.ulb.ac.be/sciences/ecoevol/software.html />. 2003.

HEDRICK, P. W. A standardized genetic differentiation measure. **Evol.** 58: 1633-1638. 2005.

HENRIQUES, O. K. Caracterização da vegetação natural em Ribeirão Preto, SP: Bases para a conservação. 2003. 270 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa da vegetação do Brasil. Rio de Janeiro, 1993.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas e de Vegetação. Rio de Janeiro. 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=169

INTERNATIONAL CONSERVATION-BRASIL. Cerrado pode sumir até 2030, alerta ONG Conservação Internacional. Ambiente Brasil Notícias. Disponível em: http://www.cenargen.embrapa.br/cenargenda/noticias2006/repams130606.pdf. 2006.

JAMES, T.; VEGE, S.; ALDRICH, P.; HAMRICK, J.L. Mating systems of three tropical dry forest tree species. **Biotropica** 30:587-594, 1998.

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

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

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

KANASHIRO, M.; THOMPSON, I. S.; YARED, J.A.G.; LOVELLESS, M.D.; COVENTRY, P.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; DEGEN, B.; AMARAL, W.A. Improving

conservation values of managed forest: the Dendrogene Project in the Brazilian Amazon. **Unasylva** 209: 26-33, 2002.

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

KIRBY, K. Rebuilding the English countryside: habitat fragmentation and wildlife corridors as issues in practical conservation. **Engl Nat Sci.** 10, 1995.

LACERDA, A.B.; SEBBENN, A.M.; KANASHIRO, M. Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, 40: 462-470, 2008.

LATOUCHE-HALLÉ, C.; RAMBOER, A.; BANDOU, E.; CARON, H.; KREMER, A. Long-disance pollen flow and tolerance to selfing in a neotropical tree species. **Mol. Ecol.** 14: 1055-1064, 2004.

LEMES, M.R. Population genetic structure and mating system of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) in the Brazilian Amazon: implications for Conservation. PhD Thesis. University of Stirling: Stirling, UK. 2000.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. GDA – Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. Disponível em: <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>. 2000.

LIAN, C.; MIWA, M.; HOGETSU, T. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity** 87: 88-98, 2001.

LOBO, J. A.; QUESADA, M.; STONER, K.E. Effects of pollination by bats on the mating system of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) populations in two tropical life zones in Costa Rica. **American Journal of Botany** 92: 370-376, 2005.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4° ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992. 352p.

LOWE, A.J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts f habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees**. Heredity** 95: 255– 73, 2005.

MAEDA, J. A. Conservação de sementes de ipê. **Bragantia** 43: 51-61, 1984.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Mol Ecol,** 7: 639-655, 1998.

MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conserv Genet**. 7:957-969, 2006.

MATIOLI, S.R. Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202p.

MCINTYRE, N.E.; RANGO, J.; FAGAN, W.F.; FAETH, S.H. Ground arthropod community structure in a heterogeneous urban environment. **Landsc Urban Plan.** 52:257– 74, 2001.

MCNEELY, J.A.; MILLER, K.R.; REID, W.V.; NITTERMEIER, R.A.; WERNER, T.B. Conserving the world's biological diversity. International Union for the conservation of nature, **Gland**. 1990.

MORAND, M. E.; BRACHET, S. A generalized heterozygote deficiency assesed with microsatellites in French common ash populations. **Mol Ecol.** 11: 377-385, 2002.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics** 30: 194 -200, 2002.

MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity** 67:167-174, 1991.

MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. Mating system and phenology of *Ceiba petandra* (Bombacaceae) in central Panama. **J. Hered.** 83: 401-404, 1992.

MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering-tree density: a test of predictions. **Biotropica** 24: 99–101. 1992b.

MURAWSKI, D. A.; GUNATILLEKE, I.A.U.N.; BAWA, K.S. The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Siri Lanka. **Conservation Biology** 8: 997-1002, 1994.

NASON, J.D.; HAMRICK, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. **J Hered.** 88: 264–276, 1997.

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

NASON, J.D., HERRE, E.A.; HAMIRICK, J.L. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. **Nature**, 391: 685-697, 1998.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Hum. Genet**. 41: 225-233, 1977.

NOVICK, R.R.; DICK, C.W.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Mol Ecol** 12: 2885-2893, 2003.

Nunney, L.; Campbell, K.A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. Trends Ecol. Evol. 8: 234-239, 1993.

OLIVEIRA, A. F; PÁDUA, J. G; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribuition of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology** 29: 294 - 307, 2006.

ORTOLANI, F.A. Morfo-anatomia, citogenética e palinologia em espécies de ipês (Bignoniaceae). 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista. Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, Jaboticabal, São Paulo. 2007.

PHILIPPI, A. Jr.; PELICIONI, M.C.F. Educação ambiental e sustentabilidade. Barueri, SP: Manole 2005. 878p.

PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista Brasil. Bot**. 27: 597 - 605, 2004.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. Biologia da Conservação. Planta, Londrina, 328p. 2002.

PROJETO FLORESTA DA USP. Fundação Florestal. Disponível em: <htttp://www.fflorestal.sp.gov.br> (Projetos / projeto floresta da USP).

RAFALSKI, J. A.; MORGANTI, M.; POWELL, W.; VOGEL, J. M.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIERREN, B. et al. (Ed.). Analysis of non-mammalian genomas: a practical guide. New York: Academia Press, 1996. p. 75-134.

RÍMOLI-ODALIA, A.; ARRUDA, E.J.; RÍMOLI, J.; BUENO, N. R.; COSTA, R.B. Biodiversidade, Biotecnología e Conservação Genética em Desenvolvimento Local. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, 1: 21 - 30, 2000.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer Mimulus guttatus. **Evolution**, 43: 848-859, 1989.

RITLAND, K. Multilocus mating system program MLTR. Version 3.1. University of British Columbia, Canada. Disponível em: http//kritland@.interchange.ubc.ca. 2004.

RITLAND, K; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, 47: 35-52, 1981.

ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; THOME, J. Cross-species amplication of cassava (*Manhihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, 87: 1647 - 1655, 2000.

ROCHA, O.J.R.; AGUILAR, G. Variation in the breeding behavior of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica. **American Journal Botany** 89:1600-1606, 2001.

ROSSETTO, M.; McLAUCHLAN, A.; HARRISS, F.C.L.; HENRY, R.J.; BAVERSTOCK, P.R.; LEE, L.S.; MAGUIRE, T.L., EDWARDS, K.J. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae) **Th. Appl. Genet.** 98: 1091-1098, 1999.

ROSSETTO, M.; HARRIS, F. C. L.; MCLAUCCHLAN, A.; HENRY, R.J.; BAVERSTOCK, P. R.; LEE, L.S. Interspecific amplification of tea tree (*Melaleuca alternifolia* – Myrtaceae) microsatellite loci – potencial implications for conservation studies. **Aust. Jour. Bot**. 48: 367 - 373, 2000.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E. F. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Sprig Harbor Laboratory, 1989.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS, E.N.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotech.** 17: 914-921, 1994.

SANTOS, D.L.; SUGAHARA, V.Y.; TAKAKI, M. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. E *Tabebuia roseo-alba* (Ridl) Sand – Bignoniaceae. **Ciência Florestal**, 15: 87-92, 2005.

SANTOS, K.L.; WELTER, L.J.; DANTAS, A.C.M.; GUERRA, M.P.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genet Mol Biol.** 30:73-79, 2007.

SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.; KAGEYAMA, P.Y.; LACERDA, M.C.B. Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides:* implicações para o manejo florestal e a conservação genética. **Revista do Instituto Florestal** 13:99-113, 2001.

SEBBENN, A. M. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Rer. Inst. Flor**. 15: 109-124. 2003.

SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: Higa, A.R; Silva, L. Pomares de sementes de espécies nativas. Curitiba: FUPEF 193-138. 2006.

SEMA – Secretaria Estadual do Meio Ambiente. Macrozoneamento das bacias dos rios Mogi-Guaçu, Pardo e Médio – Grandes questões sócio - ambientais regionais. São Paulo, 1995. 165p.

SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scien. Forest**. 57:123-139, 2000.

SHOCAT, E.; WARREN, P.S.; FAETH, S.H.; MCINTYRE, N.E.; HOPE, D. From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology. **Trends in Ecology and Evolution** 21: 186–191. 2006.

SILVA, M.B.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; TOMPSON, I.; SEBBENN, A.M. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree Bagassa guianensis in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, 255: 1548-1558, 2008.

SMOUSE, P.E.; DYER, R.J.; WESTFALL, R.D.; SORK, V.L. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. **Evolution** 55: 260-271, 2001.

SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest. Ecol. Manage**. 197: 21-38. 2004.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry: principles and practices of statistics in biological research. New York, W.H. Freeman and Company. 1995.

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

SORK, V. L.; SMOUSE, P. E.; APSIT, V. J.; DYER, R. J.; WESTFALL, R. D. Genetic structure in flowering dogwood, *Cornus florida* (Cornaceae), in the Missouri Ozarks. **Am. J. Bot**. 92: 261-271, 2005.

SPANGLER, R. E.; OLMSTEAD, R. G. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences rbcL and ndhF. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 86: 33-46, 1999.

STEINKELLNER, H., LEXER, C. ; TURETSCHEK, E. ; GL ÖSSL, J. Conservation of (GA)n microsatellite loci between *Quercus species*. **Mol. Ecol**. 6: 1189-1194, 1997.

SUN, M.; RITLAND, K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. **Heredity** 80: 225-232, 1998.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, 4: 832 - 837, 1994.

TIERRA, P. Pantanal: A emergência do novo. **Revista Teoria e Debate** 43:. 4 - 12, 2000.

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

WANIA, A.; KÜHN, I.; KLOTZ, S. Plant richness patterns in agricultural and urban landscapes in central Germany – spatial gradients of species richness. **Landscape and Urban Planning** 75: 97–110, 2006.

WARD, M.; DICK, C.W.; GRIBEL, R.; LOWE, A.J. To self, or not to self… A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in Neotropical trees. **Heredity** 95:246-254, 2005.

WEIR, B. S. Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, **Inc. Publishers**. 1996.

WEISING, K.; WINTER, P.; HUTTEL, B.; KAHL, G. Microsatellite markers for molecular breeding. **J Crop Production**, 1: 113 - 143, 1998.

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis Zucc*. **Mol Ecol** 11:1899–1910, 1999.

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in tropical dry Forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **PNAS** 99: 2038-2042, 2002.

WUNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Characterization variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple **Sci.Horticult**.113,37–43, 2007.

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSTUTA, N. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. **Theor Appl Genet**, 102: 865 - 870, 2001.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest Fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Eds) Forest Conservation Genetics: principles and practice. Collingwood: CSIRO Publishing. 352. 2000.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, 11: 413-418, 1996.

YOUNG, C. E. F. Economia do extrativismo em áreas de Mata Atlântica. In Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais / Luciana Lopes Simões, Claiton Frreira Lino (organizadores). São Paulo : Editora SENAC São Paulo, 2002.

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

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

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO J.B.; CHAVES L.J.; COELHO A.S.G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genet. Mol. Biol**. 26: 449-457, 2003.

ANEXOS

ANEXO I

Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*

Juliana Massimino Feres[*†§], Marcelo L. L. Martinez[*†‡], Carlos A. Martinez[‡], Moacyr A. Mestriner[†] and Ana Lilia Alzate-Marin[†**]

*These two authors contributed equally to this work. [†]Plant Genetic Laboratory, [§]Graduate Program in Genetics, Department of Genetics, FMRP, University of Sao Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil; [‡]Graduate Program in Comparative Biology, Department of Biology, FFCLRP, University of Sao Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, 14040-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

Keywords: Forest conservation, microsatellite marker, population genetics, *Tabebuia roseo-alba*

[**]Correspondence: Ana Lilia Alzate-Marin, e-mail: anaalzate@rge.fmrp.usp.br; Tel: +55 16 36023356; Fax: +55 16 36330069. Address: Plant Genetic Laboratory, Department of Genetics, University of Sao Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil.

Running title: Transferability of SSR markers for *Tabebuia roseo-alba*

Abstract

Microsatellite loci that were previously developed in the tropical tree *Tabebuia aurea* were used for the genetic analysis of *Tabebuia roseo-alba* populations. Nine of ten SSR markers were amplified, and the polymorphism was assessed in 58 individuals sampled from two stands in southeastern Brazil. All loci were polymorphic with Mendelian inheritance. The allele numbers were high, ranging from five to 13 in Population I and three to seven in Population II, with means of 8.9 and 5.5, respectively. We conclude that these markers can be efficiently used for parentage and gene flow studies.

As a consequence of the human-induced impact on ecosystems, the average annual rate of loss for animal and plant populations and their habitats is estimated to be 1% (Balmford et al. 2003). Forest devastation is thought to result in a loss of biodiversity even within species. Consequently, the urgent maintenance of genetic variability is fundamental for the survival of endangered species (Holsinger & Gottlieb 1991). *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae), an endangered species commonly known as ipê-branco, is an important ornamental and wood tree in Brazil. Nothing is known about the fine-scale population structure of *T. roseo-alba*. Understanding the effects of spatial isolation on the level of genetic diversity and gene flow is crucial for providing recommendations for *in situ* and *ex situ* conservation of this species. For these purposes, microsatellite markers are informative tools that can be used to assess the genetic structure of forest populations, and function as basic quantitative genetic parameters. These markers may help us predict genetic impacts by allowing us to identify evolutionarily meaningful management units as well as evolutionary responses to selective harvesting. The ability to use the same microsatellite primers on different plant species, called transferability, depends on the extent of sequence conservation in the primer sites flanking the microsatellite loci and the stability of those sequences during evolution (Choumane et al. 2000, Decroocq et al. 2003, Zucchi et al. 2003). It has been shown that closely related species are more likely to share microsatellite priming sites than more distantly related ones, but it is possible to transfer functional microsatellite primers even from more distantly related species (Lorieux et al. 2000). In this study, we transferred nine microsatellite loci from *Tabebuia aurea* to *Tabebuia roseo-alba*. These loci were characterizated in two populations of *Tabebuia roseo-alba* in southeastern Brazil in order to assess the genetic diversity and structure in this species.

Fifty-eight reproductive trees of *T. roseo-alba* were sampled in two stands that are highly impacted by agricultural practices: Population I, located in the Pardo river and Mogi-Guaçu river basins in São Paulo state and Population II, situated on the campus of the University of São Paulo-USP in Ribeirão Preto; both sites are located in southeastern Brazil. All trees in each of these two stands were tagged and mapped (36 individuals in Population I and 22 individuals in Population II). The reproductive trees sampled in Population I are being used as mothers of conserved progeny individuals in a tree Germplasm Bank at the University of São Paulo in Ribeirão Preto city (GB-USP/RP).

The genomic DNA was extracted from frozen leaf tissue using CTAB extraction method, as described by Doyle & Doyle (1990). The extracted DNA pellet was resuspended in 200 μL of TE buffer and stored at –20°C until further use. Ten microsatellite loci previously described by Braga et al. (2007) were tested. Each primer pair was screened with polymerase chain reactions (PCR) at 12 annealing temperatures (between 45–56°C) in 10 individuals of *T. roseo-alba*. For PCR amplification, 2.5 ng of genomic DNA was used in a final volume of 10 μL containing: 0.3 μM of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase, 0.25 mM of each dNTP, 1 x $MgCl_2$-free reaction buffer [75 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl and 20 mM $(NH_4)_2SO_4$] and 1.5 mM $MgCl_2$. The PCR profile used to amplify the microsatellites was 96°C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at *T*a °C (Table 1) for 1 min, and 72°C for 1 min; followed by a final elongation step at 72°C for 7 min. Amplifications were performed in a MasterCycler Eppendorf. A multiplex system based on the expected allele fragment size of each locus was tested using the same conditions for amplification. PCR products were denatured and separated on 10% denaturing polyacrylamide gels, stained with silver nitrate and sized by comparison to a 10 bp ladder standard (Invitrogen).

Mendelian inheritance analyses were made for each locus, based on two mother trees and their open-pollinated family (20 individuals per family). Population genetic parameters, such as the allele number per locus (*A*), the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, the intrapopulation fixation index (F_{IS}) and the divergence among populations (F_{ST}) were calculated using GDA (Lewis & Zaykin 2001). FSTAT (Goudet 2002) was used to test all loci for linkage disequilibrium, applying the Bonferroni correction for multiple comparisons.

From the two stands, nine microsatellite loci (90%) were amplified and all were found to be polymorphic (Table 1). Satisfactory amplification products were obtained using annealing temperatures of 49, 50 and 56°C for markers *Tau 13/Tau 27*, *Tau12/Tau15/Tau16/Tau19* and *Tau21/Tau22/Tau31*, respectively. Two biplex systems of microsatellites for *T. roseo-alba* were optimized: the *Tau21/Tau22* and *Tau15/Tau19*. Each biplex PCR was combined before electrophoresis and loaded into a single gel lane. All sibs displayed at least one of the maternal alleles, and Mendelian inheritance was confirmed for all nine SSR loci. All loci for *T. roseo-alba* were in linkage equilibrium, indicating that these markers are appropriate for population genetics studies.

These nine SSR markers were selected for screening the 58 reproductive trees from the two stands; 80 and 46 alleles were identified for Population I and Population II, respectively (Table 1). The number of alleles per locus ranged from five (*Tau 22*) to 13 (*Tau 13*), with an average of 8.9 for Population I. For Population II, the number of alleles per locus ranged from three (*Tau 12*) to seven (*Tau 21* and *Tau 15*), with an average of 5.5 (Table 1). In both stands the number of alleles per locus was observed to be lower than that in a population of 36 individuals of *T. aurea* (mean = 18.8; Braga et al. 2007). In both Populations I and II, the expected heterozygosity (H_E) was higher than observed heterozygosity (H_O) (Table 1). The fixation index of the *T. roseo-alba* populations was 0.467 (Population I) and 0.340

(Population II). These results suggest inbreeding at all loci. All loci from Population I and six loci (Tau12, Tau13, Tau16, Tau21, Tau22 and Tau27) from Population II showed significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). The observed departures from HWE might be due to population substructure (Wahlund effect), the presence of null alleles, biparental inbreeding and/or self-fertilization. Presence of null alleles was verified with MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*2004). Null alleles were suggested to occur over most of loci, however, only the loci Tau12, Tau16 and Tau22 presented null alleles as detected in the analysis of the mating system of *T. roseo-alba* in two populations (Feres JM, unpublished data). Genetic differentiation between the populations was high and significant (F_{ST} = 0.151; C.I. 95%), demonstrating that it will be important to collect future genotypes in the populations.

We conclude that the nine microsatellite markers are suitable tools for population-wide genetic and parentage studies. We are currently using these markers to investigate questions of genetic diversity, gene flow and the mating system in natural populations of *T. roseo-alba.* We aim to apply this scientific knowledge to implementing a strategy for the conservation and management of this species.

References

Braga AC, Reis AMM, Leoi LT, Pereira RW, Collevatti RG (2007) Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). Molecular Ecology Notes, 7, 53-56.

Balmford AR, Green E, Jenkins M (2003) Measuring the changing state of nature. Trends in Ecology & Evolution, 18, 326–330.

Choumane W, Winter P, Weigand F, Kahl G (2000) Conservation and variability of sequence-tagged microsatellite sites (STMSs) from chickpea (*C. arietinum* L.) within the genus *Cicer*. Theoretical and Applied Genetics, 101, 269–278.

Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. Theoretical and Applied Genetics, 106, 912 – 922.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 13–15.

Goudet J (2002) fstat version 2.9.3.2. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Available from http://www2.unil.ch/ popgen/softwares/fstat.htm.

Holsinger KE, Gottlieb LD (1991) Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: Falk DA, and Holsinger KE, (eds) Genetics and Conservation of Rare Plants, p.95–124. Oxford University Press, New York.

Lewis PO, Zaykin D (2001) GDA – Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data, Version 1.0. Cited, 2007 August 20. Available at: http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php.

Lorieux M, Ndjiondjop MN, Ghesquiere A (2000) A first interspecific *Oryza sativa* x *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic map. Theoretical and Applied Genetics, 100, 591-601.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.

Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB et al. (2003) Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. Genetics and Molecular Biology, 26**, (**4), 449-457.

Acknowledgements

This work was financed by a grant from the São Paulo State Government to ALAM: FAPESP 03/04199-4/2004. We also acknowledge the support of Research Pro-rectory of São Paulo University (USP) for ALAM and FAEPA for MAM. This study is part of the postgraduate work of the two first authors. Ana Lilia Alzate-Marin was supported by a Researcher assistantship from FAPESP. CAM is a fellow researcher of CNPq. The two first authors were supported by a postgraduate fellowship from FAPESP. We would like to thank Rosane Garcia Collevatti and Alexandre Magno Sebbenn for their valuable advice.

Table 1: Characteristics of the *Tabebuia roseo-alba* microsatellite markers in each population.

Primer name Accession no.	Primer sequence 5'- 3´	Repeat motif	Allele size range (bp)	*T*a ºC	A		H_o		H_e		Deviation from HWE	
					I	II	I	II	I	II	I	II
Tau 12 DQ666987	F: CATCATCAAGGTCAAGATCA R: CATTCTAGTCTTCCATAAGT	$(TC)_8(TA)(TG)_{29}$	140-170	50	8	3	0.429	0.350	0.647	0.660	0.0022 ND	0.003 ND
Tau 13 DQ666988	F: CCATCTCAATGCTTAACAGT R: TTGCAATGCTACCATACA	$(TC)_{22}(ACTCCC)(TC)_4(AC)_{11}$	120-170	49	13	4	0.483	0.500	0.901	0.900	0 ND	0.0002 ND
Tau 15 DQ666990	F: TTTGAGGGGTTGAAGCATTT R: CATTGTGGTCCCTCTCAACA	$(AG)_{32}$	120-150	50	9	7	0.360	0.760	0.847	0.760	0 ND	0.9292 NS
Tau 16 DQ666991	F : GCTTGTAGCAACGTTAGGTTT R : TGTGCATTGTGACTACCAGCTA	$(CT)_{33}(CA)_{11}$	140-170	50	11	5	0.640	0.250	0.898	0.780	0 ND	0 ND
Tau 19 DQ666994	F : AGGGCAAGCTTTTCCAGTTT R : TTCCTCACACGGATATGTCG	$GA)_{33}$	190-250	50	8	6	0.267	0.620	0.768	0.700	0 ND	0.2112 NS
Tau 21 DQ666996	F: CTTTTGGGGGTCTTTGGAAT R: AAGAGACAGAGACAAAGATACA	$(GA)_{26}$	210-240	56	6	7	0.438	0.450	0.767	0.780	0 ND	0.0002 ND
Tau 22 DQ666997	F: TATCTCTCCGCCGTACACCT R: CCAATCGAAGAGCCCATTTA	$(CT)_{18}(CCCTCTCGTCA)(GT)_3$	130-140	56	5	6	0.121	0.520	0.426	0.780	0 ND	0.0038 ND
Tau 27 DQ667000	F: GGTAAATCATCTTCCGCTTCC R: ACTGCAGAATCGCCTTTTGT	$(CT)_{24}(CA)_8(CC)(CA)_7$	170-220	49	12	4	0.375	0.210	0.882	0.660	0 ND	0 ND
Tau 28 DQ667001	F: TCAGCCACTACACAACCAAAG R: GGGAAGCAATGGAGTCAAAA	$(CT)_{33}$	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Tau 31 DQ666982	F: TCGTGCAGCTTTTGAGTCTG R: CTGCAAAACACAAAGCGAAA	$(CT)_{28}(CA)_{10}(CTT)(GT)_5$	240-300	56	8	4	0.633	0.710	0.821	0.570	0.0024 ND	0.2536 NS
Mean					8.9	5.5	0.416	0.490	0.773	0.74		

*T*a ºC, annealing temperature; *A*, total number of alleles per locus; I, population I; II, population II; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; NS, not significant ($P > 0.05$); ND, significant ($P < 0.05$).

ANEXO 2

Diversidade genética e endogamia de locos microssatélites em árvores adultas e progênies de *Tabebuia roseo-alba*. *k* é o número total de alelos; *R* é a riqueza alélica; A_e é o número efetivo de alelos nos locos.

Loco/*n*	300	21	300	24	20	20	20	20	300	21	300	24
	k	k	k	k	R	R	R	R	Ae	Ae	Ae	Ae
	RIB_Prog	RIB_Ad	SEL_Prog	SEL_AD	RIB_Prog	RIB_Ad	SEL_Prog	SEL_AD	RIB_Prog	RIB_Ad	SEL_Prog	SEL_AD
TAU12	6	6	9	8	5,63	6,00	6,92	7,82	3,76	3,76	5,03	5,49
TAU15	16	8	28	19	9,98	7,86	16,19	17,42	5,46	4,33	14,71	14,49
TAU16	9	6	8	8	7,22	6,00	6,58	7,92	5,03	6,06	4,15	4,59
TAU19	12	9	14	12	7,90	8,86	9,40	11,42	4,22	6,67	4,93	8,55
TAU21	14	8	12	10	9,56	8,00	9,03	10,00	5,75	5,71	5,95	8,20
TAU22	5	5	5	5	4,63	4,95	3,61	4,99	3,69	4,48	2,11	3,31
TAU27	6	6	14	13	5,60	6,00	10,93	12,21	3,50	3,70	7,75	6,71
TAU31	6	4	13	11	3,93	3,95	9,73	10,55	2,29	2,32	5,65	6,21
Média	9,25	6,50	12,88	10,75	6,81	6,45	9,05	10,29	4,211	4,630	6,284	7,194
EP(95%)	2,93	1,17	4,78	2,91	1,55	1,15	2,56	2,56	0,798	0,995	2,606	2,373

ANEXO 3

Diversidade genética e endogamia de locos microssatélites em árvores adultas e progênies de *Tabebuia roseo-alba*. H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; F é o índice de fixação.

Loco/*n*	300	21	300	24	300	21	300	24	300	21	300	24
	Ho	Ho	Ho	Ho	He	He	He	He	F	F	F	F
	RIB_Prog	RIB_Ad	SEL_Prog	SEL_AD	RIB_Prog	RIB_Ad	SEL_Prog	SEL_AD	RIB_Prog	RIB_Ad	SEL_Prog	SEL_AD
TAU12	0,341	0,500	0,481	0,542	0,734	0,734	0,801	0,818	0,535 *	0,319	0,400 *	0,3380
TAU15	0,857	0,904	0,788	0,958	0,817	0,769	0,932	0,931	-0,049	-0,176	0,155 *	-0,029
TAU16	0,485	0,572	0,399	0,542	0,801	0,835	0,759	0,782	0,394 *	0,315	0,474 *	0,3070
TAU19	0,456	0,714	0,588	0,584	0,763	0,850	0,797	0,883	0,403 *	0,16	0,262 *	0,339 *
TAU21	0,487	0,650	0,773	0,900	0,826	0,825	0,832	0,878	0,411 *	0,212	0,071	-0,025
TAU22	0,480	0,524	0,074	0,091	0,729	0,777	0,526	0,698	0,342 *	0,326	0,860 *	0,870 *
TAU27	0,293	0,500	0,517	0,583	0,714	0,730	0,871	0,851	0,59 *	0,315	0,407 *	0,315 *
TAU31	0,461	0,714	0,740	0,773	0,563	0,569	0,823	0,839	0,181 *	-0,255	0,101 *	0,0790
Média	0,482	0,635	0,545	0,621	0,743	0,761	0,793	0,835	0,351 *	0,166 *	0,313 *	0,256 *
EP(95%)	0,116	0,097	0,165	0,187	0,058	0,062	0,083	0,049	0,351 *	0,166 *	0,313 *	0,256 *