



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Instituto de Biologia  
Departamento de Genética

Mariana Carnavale Bottino

Análise da diversidade genética de populações de *Calophyllum brasiliense* Camb  
(Clusiaceae) utilizando marcadores AFLP

Rio de Janeiro  
2006

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biologia  
Departamento de Genética

Análise da diversidade genética de populações de *Calophyllum brasiliense* Camb.  
(Clusiaceae) utilizando marcadores AFLP

Autora: Mariana Carnavale Bottino

Dissertação submetida ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em  
Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ,  
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Márcio Alves Ferreira  
Co-orientador: Dr Rogério Margis

## FICHA CATALOGRÁFICA

Carnavale-Bottino, Mariana.

Análise da diversidade genética de populações de *Calophyllum brasiliense*  
Camb (Clusiaceae) utilizando marcadores AFLP.

88 páginas.

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia,  
Departamento de Genética.

1. *Calophyllum brasiliense*
2. AFLP
3. Diversidade genética
4. Distribuição genética espacial

Dedico esta dissertação aos meus pais,  
Julio e Rosa e ao meu irmão, Bruno. Vocês  
significam muito para mim. Obrigada pelo  
apoio, carinho, solidariedade e, sobretudo,  
pelo amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu irmão e toda a minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando e por ter me incentivado nas minhas decisões: Vovó, Vovô, minhas tias Anita e Cláudia, meus tios Zé e Tarcísio, e aos meus primos, Dudu e Rafinha. E aos meus parentes que não estão mais aqui.

A uma pessoa muito especial que iluminou a minha vida e que me trouxe muito carinho, amor e amizade: ao meu namorado Pedro.

Aos meus orientadores, Márcio Alves Ferreira e Rogério Margis pela oportunidade, pelos ensinamentos, amizade e compreensão.

A todos os professores do Laboratório de Genética Molecular Vegetal: Márcia Margis, Gilberto Sachetto, Maité Vaslin.

Devo uma enorme gratidão à Graça Rocha pela confiança e oportunidade de fazer parte do seu trabalho de Doutorado, com o qual pude aprender muito. Ao meu amigo Pablo Augusto pelo seu companheirismo no trabalho e conversas divertidas.

Aos meus amigos do LGMV por todos os momentos de alegria, pelas conversas, sugestões e apoio: Aline, Emília, Adriana, Fernanda, Tatiane, Vinícius, Felipe, Bia.

Ao Régis e Elisson pelas conversas engraçadas e pela incansável disposição de sempre ajudar nos trabalhos e experimentos.

Em especial a Lina Félix, Fabiano Salgueiro e a minha grande amiga Bel por terem me ajudado muito durante todo o mestrado. Desde o primeiro dia em que comecei a trabalhar na sala 74, vulgo “batcaverna”, sabia que eu ia fazer grandes amizades ali dentro. E não deu outra. Hoje, agradeço muito o esforço de vocês duas para me ajudar a concluir o meu trabalho. Agradeço também a Bel pelos momentos engraçadíssimos durante as extrações de DNA e reações de PCR. Esse trabalho sem o apoio e ajuda de vocês não seria nada.

Aos meus amigos de infância Glauco Xenofonte e Antônio Carlos por toda a nossa amizade desde a infância! Que as nossas brincadeiras fiquem sempre nas nossas lembranças e que possamos desfrutar sempre dessa amizade. Aos meus amigos Almeida e Guilherme pela amizade e carinho.

As minhas amigas Vivian e Juliana. Por mais que eu não estivesse presente em todos os momentos, sempre pensava em vocês. Espero que nossa amizade continue para sempre.

Aos técnicos Fátima, Itamar e Luis por sempre “quebrarem galhos” e auxílio quando mais precisei de ajuda.

As pessoas que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído: ao professor Fábio Scarano pela paciência e dedicação do seu tempo para as coletas. E ao professor Giancarlo Pasquali, do laboratório de Biologia Molecular Vegetal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter concedido gentilmente o uso do seqüenciador automático.

As minhas amigas e amigos de faculdade: Vanessa, Hellen, Carla, Bia, Carmen por todos os 4 anos de faculdade. Pude aprender bastante com todas vocês. Quero guardar com muito carinho todos os nossos papos divertidos e polêmicos e, pelas viagens a Picinguaba. Ao Digão e Flávio por terem me incentivado desde o início e por todo o respeito e carinho que vocês demonstraram por mim.

A Eliane, da pós-graduação por estar sempre disposta a ajudar e, pelo apoio moral nos momentos de dificuldades.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

*Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) é uma espécie arbórea que ocorre nas florestas Amazônica e Atlântica, e em determinados domínios do cerrado. Sua distribuição geográfica se estende desde o México, América Central, Paraguai, e no Brasil da Amazônia ao Rio Grande do Sul sempre condicionada à presença de solos úmidos e brejosos. A *C. brasiliense* possui importância econômica pela madeira de boa qualidade. A diversidade genética de quatro populações foi analisada utilizando marcadores AFLP. Essa técnica permite a identificação de uma grande quantidade de *loci*, assim como tem alta resolução e reproducibilidade. As populações estudadas foram: 40 indivíduos do Distrito de Guápiles, (Costa Rica); 78 indivíduos do Parque Nacional Restinga de Jurubatiba, (Macaé, Rio de Janeiro); 50 indivíduos provenientes do distrito de Oriximiná (Pará – Floresta Amazônica); e 39 indivíduos da Serra de São José, município de Tiradentes (Minas Gerais). Para a análise por AFLP desses indivíduos, as seguintes combinações de iniciadores foram utilizadas: EcoRI-CC/CT e MseI-GCAC/Mse-GACC. Perfis eletroforéticos foram convertidos em uma planilha binária e a partir daí, as análises puderam ser feitas. Foi possível obter 519 *loci* através do seqüenciador automático com polimorfismo variando de 54% a 91% entre as populações. O valor de  $F_{st}$  calculado foi de 0,26, e os resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) atribuiu 63% da variação dentro das populações. O dendograma construído com base nos marcadores AFLP revelou uma maior relação filogenética entre as populações de Oriximiná e Tiradentes, seguido de Macaé e, por último, Guápiles. As quatro populações exibiram níveis de variação condizentes com a sua distribuição espacial, sistema reprodutivo e tipo de dispersão. A estrutura genética espacial foi analisada para somente duas populações com o auxílio do programa SGS (Spatial Genetic Software). Com relação a esses dados obtidos, a população de Guápiles (Costa Rica) se comportou como uma população panmítica, em que todos os indivíduos se reproduzem ao acaso. Já com relação aos indivíduos de Macaé observa-se uma estruturação em indivíduos distantes até 75 metros, ou seja, indivíduos geneticamente mais relacionados entre si do que o esperado numa população panmítica. Esses resultados podem ser decorrentes de fatores microambientais locais que podem influenciar no comportamento da espécie e, devido aos processos de expansão das florestas tropicais que resultaram no padrão de diferenciação genética encontrado entre as populações analisadas neste estudo.

## ABSTRACT

*Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) is a canopy tree species that occurs in the Atlantic and the Amazonian forests, and in the Cerrado domains. It is widely distributed being found in Mexico, Central America, Paraguay, and in Brazil, it is found from the Amazon to Rio Grande do Sul state within Neotropical wetlands, occurring in riverine forests, floodplains and coastal swamps. This species has a good timber for using in constructions. The genetic diversity structure between four populations of *C. brasiliense* was evaluated using AFLP markers. This technique allows the identification of a great number of loci, as well as high reproducibility and resolution. The populations studied were: 40 individuals were collected from District of Guápiles (Costa Rica); of 78 individuals from the Parque Nacional Restinga de Jurubatiba (Macaé, Rio de Janeiro); of 50 individuals from Oriximiná District (Pará - Amazonian Forest); and 39 individuals from Serra de São José, Tiradentes (Minas Gerais). The AFLP reactions were led with four primers combinations (EcoRI – CC, EcoRI – CT/ Mse- GCAC, Mse- GACC) which detected 519 polymorphic *loci* with the automatic sequencer. A binary matrix was constructed based on the polymorphic bands. Diversity values ranged from 54% to 91% between the populations. The heterozygosity and diversity levels among and within the four populations were also analyzed. The *Fst* calculated was 0.26, and the Variance Molecular Analysis (AMOVA) showed that 63% of the difference was found within the populations. The distogram obtained with these combinations revealed a greater phylogenetic relationship among Oriximiná and Tiradentes, followed by Macaé (RJ) and, the last one, Guápiles (Costa Rica). The four populations exhibited levels of variation in correspondence with its special distribution, mating systems and dispersal mechanisms. The spatial genetic structure was analyzed for two populations. This method allows the estimation of the spatial genetic structure. There was no genetic structure among the Guapiles samples. The genetic distance between Macaé samples that were at least 75 meters distant from each other was lower than the expected in a panmitic population. Such correlates may give insights into the effect of local selective forces across different communities on the genetic diversity of local populations.



## SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1 A espécie <i>C. brasiliense</i>	1
1.1.1 Descrição morfológica e fenologia	2
1.1.2 Utilização	4
1.1.3 Característica da <i>C. brasiliense</i>	6
1.2 Distribuição da <i>C. brasiliense</i> : florestas tropicais alagadas	8
1.2.1 Histórico de formação das florestas tropicais	10
1.3 Diversidade genética	13
1.3.1 Fluxo gênico	21
1.3.2 Marcadores moleculares para o estudo da diversidade	26
2. Objetivo	29
3. Material e Métodos	
3.1 Áreas de coleta	30
3.2 Coleta do material vegetal	37
3.3 Extração de DNA genômico	39
3.4 Quantificação do DNA	40
3.5 Reações de AFLP	40
3.6 Análise dos fragmentos	42
3.7 Análise dos dados	43
3.7.1 Diversidade genética	43
3.7.2 Análise da distância genética	44
3.7.3 Distribuição da variabilidade genética	44
3.7.4 Estrutura genética espacial	44
4. Resultados	
4.1 Extração de DNA	45
4.2 Diversidade genética	45
4.3 Diferenciação genética	46

4.4 Distribuição da variabilidade genética e diferenciação entre populações	48
4.5 Estrutura genética espacial	48
5. Discussão	56
6. Conclusões e Perspectivas	68
7. Referência bibliográfica	70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES  
FIGURAS

Figura 1. Folha de <i>C. brasiliense</i> .	2
Figura 2. (a) – Frutos; (b) - sementes de <i>C. brasiliense</i> .	3
Figura 3. Exemplo de uma árvore adulta de <i>C. brasiliense</i> .	4
Figura 4. Distribuição da espécie <i>C. brasiliense</i> pela América do Sul e Central	8
Figura 5. Mapa representativo dos locais de coleta. 1: Macaé (RJ); 2: Tiradentes (MG); 3: Oriximiná (PA); e 4: Guápiles (Costa Rica).	30
Figura 6. Mapa ilustrativo mostrando as cidades de Tiradentes e Macaé.	32
Figura 7. Mapa ilustrativo mostrando Oriximiná na região Norte do Brasil.	35
Figura 8. Mapa da Costa Rica.	37
Figura 9. Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978) para as quatro populações de <i>C. brasiliense</i> utilizando 519 loci AFLP.	48
Figura 10. Distribuição espacial dos indivíduos de <i>C. brasiliense</i> da população de Guápiles (Costa Rica).	50
Figura 11. Resultado das análises de estrutura genética espacial entre os 40 indivíduos coletados em Guápiles com base nos 519 loci.	51
Figura 12. Resultado das análises de estrutura genética espacial entre os 78 indivíduos coletados em Macaé, com base nos 519 loci.	53
Figura 13. Distribuição espacial dos indivíduos de <i>C. brasiliense</i> da população de Macaé (RJ).	54
Figura 14. Resultado das análises de estrutura genética espacial entre os 63 indivíduos da subpopulação Macaé 1, com base nos 519 loci	55

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## TABELAS

Tabela 1. Populações, número de indivíduos e material coletados	38
Tabela 2. Estimativas de diversidade genética em populações de <i>C. brasiliense</i>	46
Tabela 3. Estimativa de <i>Fst</i> analisada par a par obtidas para quatro populações de <i>C. brasiliense</i> .	47
Tabela 4. Distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de <i>C. brasiliense</i> com base na análise de variância molecular (AMOVA).	48
Anexo 1. Posições geográficas obtidas por GPS.	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	polimorfismo no comprimento de fragmento amplificado
°C	graus Celsius
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
ng	nanograma
µg	micrograma
mL	mililitro
µL	microlitro
M	molar
mM	milimolar
pb	pares de base
PCR	reação da polimerase em cadeia
pH	potencial hidrogênico
pmol	picomoles
PVP	polivinilpirrolidona
rpm	rotações por minuto
TAE	tampão tris, acetato e EDTA
TE	tampão tris e EDTA
Tris	tri-hidroximetil aminometano
U	unidade de enzima
V	volts

## 1 Introdução

### 1.1 A espécie *C. brasiliense* Camb.

*Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) é conhecida popularmente na região Sudeste do Brasil como Guanandi, palavra proveniente do tupi gwana'di que significa "o que é grudento". É provável que o nome esteja relacionado ao látex pegajoso de coloração amarelo-esverdeada eliminado pela casca e pelas folhas, e porque os frutos possuem uma polpa branca e viscosa. Na Amazônia ela é conhecida como jacareúba; na América Central recebe o nome de cedro maria ou santa maria. Esta espécie arbórea possui ampla distribuição, ocorrendo desde o México, América Central até o Paraguai. No Brasil, o guanandi pode ser encontrado da Amazônia ao Rio Grande do Sul. É encontrada desde o nível do mar até 1500m de altitude, em locais de precipitação média anual entre 1100 e 4000 mm, e temperatura média anual entre 15°C e 28 °C. No Brasil, é encontrada na Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e restinga, e em Florestas de Galeria e Ciliares do interior do país, principalmente em locais com solo inundado (Reitz e col., 1978). É uma espécie pioneira característica e exclusiva de florestas pluviais e sempre dependente da umidade do solo (Reitz e col., 1978). A condição hídrica do local é um dos fatores que influenciam na distribuição de seus indivíduos (Kawaguici e Kageyama, 2001).

### 1.1.1 Descrição morfológica e fenologia

Estas árvores têm com altura variando de 2,5 a 30 m e DAP (diâmetro à altura do peito) máximo de 1,80 m. Possui tronco ereto e cilíndrico e a copa é piramidal a ovóide. A casca de coloração parda é dura, amarga e aromática. As folhas são pecioladas, simples, oblongas, elípticas, brilhantes em ambas as faces, sem cera, coriáceas, glabras; as nervuras laterais são numerosas, paralelas, muito próximas entre si e proeminentes em ambas as faces (figura 1).



Figura 1: Folha de *C. brasiliense* (Lorenzi, 1992)

As inflorescências são racemosas ou compostas de ramos curtos, com 2-10 flores axilares e pedicelo de 5-10 mm. As flores têm pétalas reflexas de coloração creme-amarelada, aromáticas com estames numerosos nas flores masculinas e poucos nas hermafroditas. Os frutos são globosos, ovóides ou elipsóides, sendo classificado com drupa (Marques & Joly, 2000) com 2,5 a 3 cm de diâmetro. O epicarpo coriáceo apresenta coloração verde e cada fruto contém geralmente 1 semente (figura 2A e B).

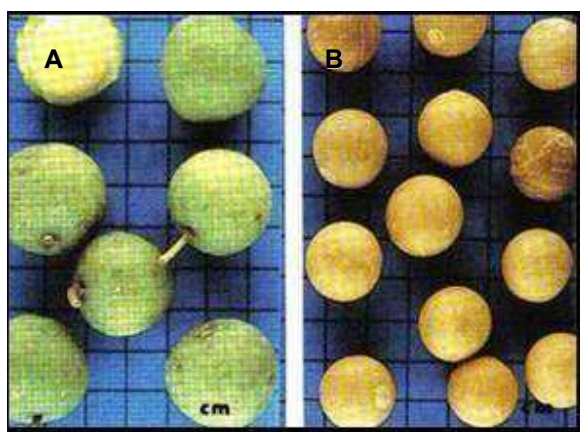


Figura 2: (A) – Frutos; (B) - sementes de *C. brasiliense* (Lorenzi, 1992).

Flores podem ser encontradas durante todo o ano, contudo a floração está mais concentrada nos meses de junho e julho. Variações no padrão de floração são encontradas ao longo de sua ampla distribuição geográfica. Flores unissexuais ou hermafroditas podem ser encontradas numa mesma árvore. A dispersão é realizada principalmente por morcegos do gênero *Artibeus* (Mello e col., 2005), enquanto que roedores e pássaros são considerados secundários. A água também pode contribuir para dispersão dos frutos de *C. brasiliense* (Marques e Fisher, dados não publicados; Marques & Joly 2000). A frutificação ocorre de fevereiro a setembro.



### 1.1.2 Utilização

Nativa no Brasil, a madeira tem sido utilizada desde o século XVII para a construção naval, devido à sua durabilidade e resistência à água. Foi explorado predatóriamente pelos brasileiros até a sua quase extinção. Pela sua importância na construção naval, em 1810, o governo Imperial reservou para o estado o monopólio de exploração da sua madeira, sendo, portanto, historicamente a primeira Madeira de Lei do Brasil (Lorenzi, 1992). Atualmente é uma das espécies florestais de maior interesse devido à gama de produtos que podem ser produzidos a partir da sua madeira. É estável e durável, podendo ser usada para construções internas e externas em geral, pisos, móveis, embarcações dentre outras. A árvore é bastante ornamental podendo ser empregada no paisagismo em geral (figura 3).



Figura 3. Exemplo de uma árvore adulta de *C. brasiliense*.

Tem importância medicinal, como o chá de suas cascas que pode ser obtido por infusão, que é um remédio popular utilizado para tratamento de reumatismo, hemorróidas e úlceras crônicas (Correa e col., 1984). Também é empregado na cura de enfermidades cutâneas, e usado como aromatizante natural (semelhante ao sândalo). Estudos fitoquímicos realizados por pesquisadores do Instituto Nacional do Câncer isolaram um calanolídeo a partir de espécies de *Calophyllum*, e tem sido observado que pode funcionar como uma das substâncias químicas mais ativas frente ao vírus HIV-1 (Ito e col., 2003). Da Silva e col. (2001) realizaram também estudos com a *C. brasiliense* e observaram a presença de diversas substâncias químicas, tais como xantonas, sitosterol e triterpenos no caule na resina. Algumas cumarinas isoladas dessa espécie apresentaram atividade anticancerígena e antimicrobiana (Ito e col., 2003; Chilpa e col., 2004). Apesar da sua possível utilização farmacológica, a exploração do *C. brasiliense* é atualmente voltada para a construção de mastros de navios, embarcações, pisos, portas e móveis. A qualidade da madeira quando comparada com espécies como o *Eucalyptus* spp e o *Pinus* spp apresenta valor comercial 100 vezes maior (Lorenzi, 1992). O guanandi tem sido citado por especialistas como uma possível espécie promissora em substituição ao mogno, o qual atualmente, possui corte proibido no Brasil (Revista da Madeira, 2005) e o preço médio de venda é de R\$ 2.000,00/m<sup>3</sup>. Como se trata de uma espécie pioneira, também é bastante requisitado para reflorestamento de áreas degradadas. Outro fator que contribui para essa característica é a utilização do fruto pela fauna (Lorenzi, 1992).

### 1.1.3 Características da *C. brasiliense*

A saturação hídrica do solo e a conseqüente diminuição na quantidade de oxigênio disponível para o sistema radicular selecionaram, ao longo do processo evolutivo, plantas capazes de sobreviverem à inundação sazonal ou permanente. A inundação desencadeia uma série de processos físico-químicos e biológicos que influenciam na qualidade do solo como meio para o desenvolvimento das plantas (Ponnamperuma, 1984). Sendo assim, a germinação e o crescimento das plantas podem ser comprometidos, dependendo da espécie em questão e da duração da inundação (Kozlowiki, 1984). Os ambientes florestais neotropicais variam muito em relação à duração, freqüência e amplitude do alagamento. Em várzeas e igapós amazônicos, a inundação é sazonal podendo chegar a cobrir a copa das árvores durante aproximadamente seis meses. Já nas florestas da planície litorânea, encontradas no Sudeste e Sul do Brasil, a inundação pode ser permanente ou periódica atingindo apenas alguns centímetros acima do nível do solo (Scarano, 1998). O alagamento das florestas ciliares está relacionado ao regime de chuvas, que podem ser sazonais ou não. Com isso, as espécies Neotropicais características destes tipos de ambientes devem apresentar adaptações morfológicas, anatômicas ou metabólicas que permitem suportar o estresse decorrente da falta de oxigênio. Entre as árvores típicas desses ambientes, a *C. brasiliense* é uma das espécies mais abundantes.

Estratégias de frutificação e dispersão dos frutos são importantes para o sucesso no estabelecimento de uma espécie em áreas inundadas, associada à capacidade desses sobreviverem na água. Marques & Joly (2000), em um estudo sobre a germinação e crescimento de *C. brasiliense*, constataram que os frutos são dispersos por morcegos e pela água, no período mais chuvoso. Apesar da semente não germinar,

ela se mantém viável, pelo menos, por três meses submersa ou enterrada no solo encharcado. Ao encontrar microsítios favoráveis, por exemplo, quando ocorre a redução do nível da água, a semente germina. Scarano e col. (1997) também observaram o mesmo resultado. Em seu trabalho, o pericarpo de algumas sementes foi removido e, de outras não. Foi testada a capacidade germinativa dessas sementes e observou-se que após duas semanas 60% das sementes que não tinham o pericarpo e, apenas 18%, cujas sementes estavam intactas, germinaram.

A manutenção das florestas ciliares e de outros ambientes neotropicais sujeitos à saturação hídrica do solo depende das estratégias que permitam a sobrevivência da espécie. No caso de *Talauma ovata* St-Hill., que também é encontrada em florestas higrófilas, a dispersão das sementes ocorre no período seco e as sementes não só deixam de germinar, como perdem a viabilidade se mantidas submersas (Lobo e Joly, 1998). Por outro lado, espécies do gênero *Inga*, como *Inga laurina* (Swartz) Willd. (Okamoto, 1998), típica de ambientes alagados, frutificam em plena estação chuvosa e a submersão não inibe o potencial nem a velocidade de germinação.

Outro aspecto importante para a sobrevivência da espécie refere-se às adaptações morfoanatômicas da planta à baixa disponibilidade de oxigênio no substrato. De acordo com Scarano e col. (1997), num estudo comparativo com outras duas espécies da família Clusiaceae, *Tovomitopsis paniculata* (Spreng.) e *Symphonia globulifera* L., a espécie *C. brasiliense* não apresenta estruturas morfológicas comuns de plantas adaptadas a locais inundados, tais como lenticelas hipertróficas e raízes adventícias, que poderiam permitir um aumento na difusão de oxigênio da parte aérea para o sistema radicular. No entanto, *C. brasiliense* possui outras características adaptativas que permitem a colonização em locais inundados, como sementes capazes

de boiar, capacidade de dispersão e tolerância à anoxia. Envolve também uma série de qualidades que otimizam o estabelecimento e sobrevivência nesse ambientes, como dormência das sementes e dispersão dos frutos pela água e por morcegos, principalmente.

## 1.2 Distribuição da *C. brasiliense*: florestas tropicais alagadas

De acordo com Oliveira-Filho e Ratter (1995), a *C. brasiliense* é encontrada nas Américas do Sul e Central (figura 4).



Figura 4 : Distribuição da espécie *C. brasiliense* pela América do Sul e Central, com exceção das ilhas do Caribe. Pontos verdes indicam locais, nos quais a ocorrência foi confirmada. *Fonte:* Oliveira-Filho e Ratter (1995).

A sua ocorrência está bem restrita a locais alagados, conhecidos como florestas alagadas. Estas, por sua vez, são áreas que oscilam entre fases terrestres e aquáticas. São periodicamente inundadas por refluxo lateral de rios e/ou pela precipitação direta ou água subterrânea. O ambiente físico-químico resultante faz com que a biota responda com adaptações morfológicas, fisiológicas, anatômicas e/ou fenológicas (Junk e col., 1989). Cobrindo aproximadamente 6% da superfície da Terra, as florestas alagadas encontram-se dentre os ecossistemas mais ameaçados (Maltby, 1991). Esses locais são apropriados para estudos ecológicos devido à sua variabilidade espacial e temporal (Joly, 1991) e ao gradiente terrestre-aquático que eles representam (Malanson, 1993) promovendo a manutenção e dinâmica das comunidades do seu entorno. A respeito disso, a América do Sul é caracterizada principalmente por planícies alagadas (Klinge e col., 1990), ocorrendo no Brasil como terrenos alagadiços (pantanal e as várzeas) e florestas de galeria (Joly, 1991). Muitos desses ecossistemas ribeirinhos apresentam intensa erosão e grande quantidade de depósito proveniente de locais mais altos, desempenhando um papel importante na regeneração florestal e diversidade de espécies dos ecossistemas associados (Salo & Kalliola, 1991). Na maioria dos casos, a ocorrência das matas de galeria está confinada aos fundos dos vales que definem seus limites, os quais ocorrem geralmente com o campo limpo e, menos freqüentemente, com outras comunidades da região (Felfili e col., 1994). Segundo Felfili e col. (2001a), as matas de galeria contribuem com 33% da riqueza fanerogâmica no Brasil Central, apesar de ocuparem cerca de 5% do território. No entanto, com o avanço crescente da agricultura e dos centros urbanos, junto com a falta de rigor no cumprimento da lei, a sua existência está ameaçada (Marimon, e col., 2002).

Segundo Veneklaas e *col.* (2005), os ecossistemas ribeirinhos são as principais fontes de material orgânico para os animais que vivem nos córregos dos rios (Kangas, 1994), e funcionam como tampões contra detritos provenientes de áreas mais altas, como sedimentos, nutrientes e produtos químicos utilizados em agricultura (Lowrance e *col.*, 1984). São também fonte de alimento e habitat para a fauna, e servem como corredor para a migração de animais (Ratter e *col.*, 1997; Medellín e Redford, 1992).

### **1.2.1 Histórico da formação das florestas tropicais**

Existem registros paleoambientais das mudanças das florestas tropicais da América do Sul decorrente da expansão e contração das formações florestais durante as flutuações climáticas do período Quaternário. Dados geológicos obtidos com o estudo dos solos, das formações vegetais e da palinologia, além da distribuição atual de plantas e animais, evidenciam a ocorrência de eventos climáticos como, baixas temperaturas e clima mais seco, em que houve a expansão de formações abertas de vegetação e, ao mesmo tempo, a contração das florestas durante a última máxima glaciação (Van der Hammen, 1982). Muitos estudos indicam dois períodos secos e frios de contração de florestas: o primeiro e mais severo durante o Pleistoceno, coincidindo com a glaciação Würm-Wisconsin no hemisfério Norte, e o segundo durante o Holoceno (11.000 anos AP, antes do presente) (Ab'Saber, 1979, 1980).

Em estudos paleopalínológicos que englobaram a província do Cerrado no Brasil central, realizado em Salitre, a oeste de Minas Gerais, Ledru (1991, 1993) concluiu a partir das análises da distribuição do pólen e do padrão encontrado nos dias atuais da vegetação e do clima foi que, entre 33.000 e 25.000 mil anos AP, a região era mais

úmida do que o presente e era coberta por floresta tropical (Ledru, 1993). Durante a glaciação do Pleistoceno, de 17.000 a 13.000 mil anos AP, um clima mais seco predominou e a proporção de árvores na vegetação declinou. Em outro estudo, baseado na análise da distribuição das espécies, Prado & Gibbs (1993) propuseram que a região de vegetação seca (cerrado e caatinga) encontrada no presente já foi coberta principalmente por uma extensa vegetação arbórea quando o clima era mais úmido durante a glaciação do Pleistoceno. Tais dados corroboram os estudos de Ledru (1993), que sugeriu o predomínio de uma vegetação arbórea sazonal durante o Pleistoceno, quando o clima pode ter sido mais úmido do que o encontrado atualmente. Neste mesmo último estudo, o período seguido pela última glaciação máxima do Pleistoceno foi caracterizado pela expansão das florestas de Araucária, indicando a predominância de um clima mais frio e úmido até 8.500 mil anos AP. Este período sofreu uma rápida e brusca interrupção entre 11.000 e 10.000 anos AP, correspondendo a um intervalo de clima seco acompanhado da retração das florestas. Após 8.500 mil anos AP, as florestas de Araucária foram substituídas por uma floresta mesofítica, indicando um episódio de clima úmido com altas temperaturas perdurando até 5.500 mil anos AP. O intervalo de clima seco durante o Holoceno médio (5.000 mil anos AP) causou uma grande redução das florestas. Após isso, ocorreu a expansão das florestas mais uma vez, mas não o suficiente para recobrir toda a extensão anteriormente ocupada. As áreas isoladas de cerrado que são encontradas no entorno da floresta Amazônica evidenciam a ocorrência de expansão florestal através de paisagens dominadas pelo cerrado e a manutenção da vegetação do mesmo em áreas onde as condições climáticas favoreciam o predomínio das florestas (Bigarella e *col.*, 1975).



A província do Cerrado segundo Oliveira-Filho & Ratter (1995) engloba as regiões do Brasil Central, incluindo a vegetação da Caatinga na região Nordeste se estendendo até a província do Chaco, na Argentina, Paraguai e Bolívia. No entanto, a mesma tem sido considerada por muitos autores como um impedimento à migração das espécies entre as duas maiores regiões florestais da América do Sul (florestas Amazônica e Atlântica), e com isso, torna-se claro as diferenças na composição florística entre elas (Oliveira-Filho e Ratter, 1995). Por outro lado, essa distribuição disjunta de um número considerável de espécies na Mata Atlântica e a floresta Amazônica sugere a possibilidade de ligação entre elas no passado (Rizzini, 1963; Andrade-Lima, 1966). Andrade-Lima (1964) ainda sugere uma possível rota migratória através da floresta mesofítica, a qual pode ter atravessado a atual província da Caatinga do nordeste do Brasil em determinados períodos do Terciário (65 milhões a 5 milhões de anos AP).

Vários autores sugeriram anteriormente que as florestas de galeria (ou florestas alagadas) do Brasil central representam intrusões florísticas das florestas Amazônica e Atlântica dentro do domínio do cerrado. Cabrera e Willink (1973) mencionaram que as galerias são atualmente uma rede de conexão entre as províncias Amazônica e Paranaense. Baseado em similaridades florísticas, Rizzini (1979) afirma que as galerias, junto com outras formações interioranas, são extensões de uma grande floresta Atlântica.

Segundo Oliveira-Filho & Ratter (1995), a distribuição das espécies endêmicas às florestas de galeria observadas em seu estudo aponta evidências a respeito da sobrevivência dessas florestas durante as glaciações. No entanto, é provável que tenha

havido uma redução na extensão dessas florestas durante os períodos mais secos e áridos.

As florestas de galeria apresentam interfaces com outros tipos vegetacionais, incluindo as florestas tropicais e o cerrado. E, desta forma, elas são sujeitas a diferentes influências florísticas resultando em grande heterogeneidade. As florestas de galeria, indubitavelmente, contêm grande diversidade florística. Além disso, elas são importantes para a fauna do cerrado e agem como corredores migratórios. Com isso, qualquer prática conservacionista de biodiversidade no Brasil deve proteger prioritariamente as florestas de galeria e ambientes ribeirinhos (Oliveira-Filho & Ratter, 1995).

### **1.3 Diversidade genética**

De acordo com Hamrick (1983), o estudo da diversidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis de variação genética mantida dentro das populações, bem como a forma em que a variação genética é dividida dentro e entre as populações. Para Gaiotto e *col.* (2003), a dinâmica populacional de plantas pode afetar significativamente fatores evolutivos como a seleção e a deriva gênica, e conseqüentemente, proporcionar impactos importantes na estrutura genética populacional. No entanto, a magnitude dos efeitos da deriva e da seleção vai depender da capacidade reprodutiva do organismo e do fluxo gênico. A estrutura genética é resultado da dispersão, sobrevivência e reprodução dos indivíduos numa população ao longo do tempo. Para tanto é necessário compreender, além do sistema de acasalamento e a fertilização, fatores ecológicos e a história de vida, à medida que os

mesmos influenciam a dinâmica evolutiva e ecológica das populações (Loveless e col., 1998).

A diversidade genética intrapopulacional pode ser caracterizada pelos índices: porcentagem de *loci* polimórficos, heterozigosidade esperada no equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidade observada e índice de fixação (Cavallari-Neto, 2004). Hamrick & Godt (1990) reportam heterozigosidade média esperada de 0,123 para espécies vegetais com dispersão de sementes por anemocoria e de 0,124 por espécies polinizadas por animais.

Diferentes abordagens têm sido constantemente aplicadas na determinação da estrutura genética populacional e diversidade em espécies vegetais (Gillies e col., 1997). Inclui-se nessas análises isoenzimas (Hamrick, 1990; Doligez e Joly, 1997;), aloenzimas (Loveless e col., 1998), RFLPs e métodos baseados na análise na reação em cadeia da polimerase (PCR), tais como microssatélites (Aldrich e col., 1998; White e col., 1999; Lemes e col., 2003) e amplificação aleatória de polimorfismos de DNA (RAPD) (Schierenbeck e col., 1997; Gillies e col., 1997) e AFLP (Margis e col., 2002; Cavers e col., 2003).

Margis e col. (2002) analisaram o nível de variabilidade inter e intrapopulacional entre três populações naturais vizinhas de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) utilizando marcadores AFLP e observaram que o grau de diferenciação populacional, baseado no valor de  $G_{st}$ , era maior do que o esperado para populações separadas por apenas alguns quilômetros (a maior distância era de 28 Km). A esse resultado foi considerado, o grau de impacto e degradação submetido em cada população.

Verifica-se que em populações constituídas por poucos indivíduos a ocorrência de fenômenos genéticos como a deriva genética e a endogamia (autofecundação e

cruzamento entre indivíduos aparentados) ocasionam a perda de heterozigosidade. Portanto, para a efetiva conservação genética ou exploração de uma espécie, deve-se conhecer a forma em que a variação genética ocorre entre e dentro das populações e sua estruturação na natureza.

Estudos na estrutura intrapopulacional de espécies arbóreas têm demonstrado que a distribuição de alelos e genótipos não é aleatória dentro das populações. Tal estrutura pode ser determinada pela dispersão de pólen e sementes, habitat de distribuição e seleção microambiental (Hamrick, 1983). Collevatti e *col.* (2001), em um estudo baseado em microssatélites com a espécie *Caryocar brasiliense*, típica da região do Cerrado do Brasil, observaram que os alelos não eram distribuídos aleatoriamente entre e dentro das populações. O baixo fluxo gênico entre os indivíduos ocorria devido à limitada dispersão das sementes, a qual ocorria por gravidade. E, os morcegos polinizadores desta espécie não percorriam longas distâncias, e por isso, os indivíduos formavam agregados. Os fatores que afetam a reprodução e o fluxo gênico são particularmente determinantes da estrutura genética de populações (Loveless & Hamrick, 1984). Polinizadores como morcegos e beija-flores, por exemplo, devido à sua capacidade de vôo, promovem um aumento da variabilidade dentro de populações, enquanto diminuem a divergência entre populações ao mantê-las ligadas por fluxo gênico. Da mesma forma, sementes dispersas pelo vento promovem o deslocamento de alelos dentro da população e eventualmente entre populações. Schierenbeck e *col.* (1997) estudaram quatro espécies tropicais na Costa Rica através de marcadores de DNA RAPD, e observaram que, em três das quatro espécies estudadas, as distâncias genéticas encontradas foram altas em distâncias que variaram de 1 a 9 Km. O limitado fluxo gênico mesmo dentro das populações pode levar à formação de pequenos grupos

de indivíduos geneticamente mais similares (Fisher e col., 2000). O papel dos diferentes sistemas de cruzamento presente nas plantas ainda não está bem estabelecido. Mas, é sabido que a relação temporal e espacial entre indivíduos próximos aumenta a probabilidade de intercruzamento e, quanto mais restritos forem os mecanismos de dispersão, maiores as chances dos indivíduos serem aparentados (Coles & Fowler, 1976). O cruzamento entre parentes gera endogamia, e a longo prazo pode levar a um aumento na divergência genética entre populações. Essa endogamia pode ser determinada pela distância e taxa com que os genes migram dentro e entre as populações (Coles & Fowler, 1976), ou pelo seu sistema de reprodução, mais especificamente pela taxa de autofecundação. A fragmentação florestal é uma das causas da diminuição da diversidade genética de espécies tropicais através da interrupção do fluxo gênico e isolamento, potencialmente levando a espécie ao endocruzamento (Bawa e Dayanandan, 1998). Evidências que a fragmentação pode induzir a mudanças na estrutura genética, fluxo gênico e no padrão reprodutivo de populações tropicais foi visto por alguns autores, por exemplo, Hall e col., 1996, Nason e Hamrick, 1997; Aldrich e col., 1998; Collevatti e col., 2001. Em Dayanandan e col. (1999) a hipótese de que a fragmentação florestal reduz o fluxo gênico entre as populações foi testada. Este estudo foi conduzido com a espécie *Carapa guianensis* (Meliaceae), típica da América do Sul e Central, utilizando marcadores microsatélites. Foi observado que em uma das populações, que é fragmentada, a distância genética entre os indivíduos era muito maior do que nas outras duas populações não fragmentadas. Seus dados ainda sugeriram que a fragmentação florestal pode alterar a estrutura e dinâmica populacional regional.

Uma das características observadas em estudos genéticos de populações tropicais é que a maior parte da variação genética é encontrada dentro das populações (Hamrick e Loveless, 1986, 1989; Moran e Hopper, 1987; Hamrick e Godt, 1990; Prober e *col.*, 1990; Schierenbeck e *col.*, 1997; White e *col.*, 1999). No entanto, em espécies tropicais amplamente distribuídas geograficamente, a diferenciação genética entre populações distantes pode aumentar, principalmente em áreas geográficas separadas por longos períodos evolutivos (Moran, 1992; Chalmers e *col.* 1992; Wickneswari e *orwati*, 1993; Chase e *col.*, 1995; Gillies e *col.*, 1997; White e *col.*, 1999). A distribuição e a quantidade de variação genética é influenciada por fatores como sistema de acasalamento, distribuição geográfica, longevidade e fecundidade (Hamrick e Godt, 1990).

Os efeitos da depressão por endocruzamento (perda de diversidade e adaptabilidade por endocruzamento), geralmente se manifestam de forma mais acentuada nos estágios tardios do ciclo de vida da planta, podendo ocasionar uma grande redução na produção de flores e frutos. Assim, o efeito da perda de variabilidade por endocruzamento não apresenta nenhum efeito acentuado na disfunção, mas seus efeitos afetam a probabilidade de sobrevivência após o estabelecimento da planta. Desta forma, a variabilidade genética influencia de maneira determinante a capacidade de uma população responder às mudanças ambientais (Barret & Kohn, 1991).

Em espécies que apresentam sistema misto de reprodução e mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes, resultando em fluxo gênico a longa distância, é esperada baixa endogamia apresentando variação genética alta dentro das populações e baixa entre elas. Se, contudo, o fluxo gênico é restrito, populações

pequenas, de autofecundação, deverão mostrar baixa variabilidade intrapopulacional e alta entre as populações (Loveless & Hamrick, 1984). Em um estudo com *Swietenia humilis* (Meliaceae), White e col. (1999) encontraram a maior parte da variabilidade genética dentro dos fragmentos analisados, distantes até 5 Km e, um alto fluxo gênico entre eles mediado por abelhas, borboletas e outros insetos. Kageyama & Lepsch-Cunha (2001) discutem que o fluxo gênico via pólen e sementes têm demonstrado estarem associados à estrutura genética das populações de espécies arbóreas tropicais, na qual a distância do vôo dos polinizadores e dispersores podem indicar o nível da variação genética dessas espécies.

Espécies arbóreas geralmente possuem um grau relativamente alto de variação genética quando comparadas com outras plantas e espécies animais (Mitton, 1983). As interações entre os organismos como a polinização e a dispersão de sementes, que nas florestas tropicais é na sua grande maioria por animais, e que se pode resumir como fluxo gênico (via pólen e sementes), e que é o responsável pela existência de toda a diversidade das espécies arbóreas. Hamrick (1983) discute que o padrão genético da floresta tropical, onde processos como a dispersão de pólenes e sementes, estágios sucessionais e o sistema reprodutivo devem ser analisados e levados em consideração. Em um estudo de estrutura e dinâmica populacional de *C. brasiliense*, Marques e Joly (2000) observaram uma agregação de todas as classes de tamanho da população (plântulas, jovens e adultos), ou seja, essa distribuição reflete um padrão em espécies que apresentam “pontos de origem”, os quais são locais onde há altas densidades populacionais rodeados por áreas de menor densidade (Hubble, 1979). No estudo realizado por Kawaguici e Kageyama (2001) foram utilizados marcadores isoenzimáticos, em uma população em mata de galeria, na Estação Ecológica do

Panga (Uberlândia, MG). O estudo visou obter informações sobre a estrutura genética de três grupos de indivíduos dessa população (plântulas, jovens e adultos).

A grande maioria dos estudos sobre genética populacional foi desenvolvida em escalas geográficas pequenas, e o primeiro marcador genético empregado foi a isoenzima (Hamrick e Loveless 1986; Loveless 1992, 1998; Alvarez-Buylla e Garay 1994; Hall e *col.* 1994). No trabalho de Lemes e *col.* (2003) foi realizado o primeiro trabalho sobre a estrutura genética populacional de uma espécie arbórea Neotropical encontrada na Amazônia abrangendo uma vasta distribuição geográfica (2100 Km). O objetivo foi caracterizar a estrutura genética de populações naturais da espécie *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) usando marcadores microssatélites e, foi visto que o grau de diferenciação entre as populações foi moderado, cujas distâncias geográficas variaram de 8 a 2100 Km. Considerando a ampla escala geográfica do estudo de Lemes e *col.* (2003), os dados indicaram níveis de diferenciação menores do que o esperado entre as populações de *S. macrophylla*, já que a sua distribuição na floresta é caracterizada por manchas esparsas, polinizadas por insetos e, cujas sementes são dispersas pelo vento.

Apesar dos efeitos da perda de diversidade genética serem notórias, as dificuldades em estimar as perdas em número de espécies extintas ainda são freqüentes. Esta dificuldade é devido ao desconhecimento dos níveis atuais de diversidade e da distribuição de espécies. Estudos importantes a serem considerados estão relacionados ao entendimento da variação genética, da ecologia e da biogeografia de espécie de árvores tropicais buscando compreender o comportamento da espécie possibilitando a formulação de melhores políticas de desenvolvimento e manejo das áreas de conservação (Palmberg-Lerche, 1994).



Portanto, o estudo da diversidade genética torna-se fundamental para a compreensão do comportamento das espécies, sobretudo em relação às espécies encontradas nas florestas tropicais, as quais possuem grande diversidade genética. O estudo da variabilidade genética das populações consiste na análise de como as mesmas estão estruturadas, ou seja, de como a diversidade está distribuída entre e dentro das populações de uma espécie. E é nesse contexto, que o estudo da diversidade de *C. brasiliense* foi inserido.

Constata-se a importância do estudo da variabilidade genética para o potencial evolutivo de uma espécie, e ainda determina suas chances de sobrevivência em longo prazo (Fleishman e col., 2001). É considerada “matéria-prima” que possibilita as mudanças evolutivas de uma espécie. Populações com pouca variabilidade genética podem ser incapazes de responder às mudanças ambientais (Jones e col., 2001), ou seja, apresentam baixo potencial evolutivo podendo causar redução da *fitness* (adaptabilidade), tanto do indivíduos quanto da população. A redução da variabilidade pode ainda conduzir uma espécie à extinção (Bouzat, 2001), sendo, portanto, uma das principais ameaças à existência de uma espécie.

### 1.3.1 Fluxo gênico

Os padrões de diversidade genética encontrados em árvores são diretamente regulados pelo sistema reprodutivo e o fluxo gênico. A força e a magnitude espacial da estruturação populacional podem influenciar e serem influenciadas por uma variedade de fatores, incluindo processos históricos (vicariância, dispersão) e seleção (Epperson e Li, 1996, 1997; Cavers e *col.*, 2005). A nível populacional, as diferenças interespecíficas são devido à forma de vida e ao sistema de reprodução, e diversos outros trabalhos (Hamrick e *col.*, 1992; Degen e *col.*, 2001a; Vekemans e Hardy, 2004; Ward e *col.*, 2005) identificaram padrões generalizados. Foi visto que espécies que realizam autofecundação mantêm forte estruturação genética, enquanto que espécies com fecundação cruzada, pólen dispersos por animais e, sementes por gravidade, apresentam estruturação ainda maior.

O fluxo gênico está relacionado aos mecanismos de dispersão de pólen e sementes, os quais determinam o agrupamento genético espacial de populações. Espécies típicas de locais temperados, por exemplo, o carvalho (*Quercus* sp.), são polinizadas pelo vento. Se houver uma alta densidade de espécies, esse tipo de polinização pode resultar em alta frequência de troca de pólen e, conseqüentemente, alta diversidade genética entre as populações. Espécies arbóreas tropicais são em sua maioria polinizadas por animais. Bawa e *col.* (1985) em estudo na Ilha Barro Colorado, Panamá, constataram que a maioria das espécies arbóreas é polinizada por insetos, morcegos e beija-flores. Análises de sistemas de acasalamento em espécies tropicais baseadas em marcadores moleculares revelaram altas taxas de fecundação cruzada e dispersão de pólen a longas distâncias para uma variedade de animais polinizadores (Boshier e *col.*, 1995a; Stacy e *col.*, 1996; Loveless e *col.*, 1998; Nason e *col.*, 1998;

Ward e col., 2005), e que tanto as taxas de dispersão quanto a dispersão de pólen a longas distâncias, por sua vez, são sensíveis a fatores ecológicos, e mostram variação em escalas espaciais e temporais (Nason e Hamrick, 1997). Segundo Gusson e col. (2005) se o comportamento de vetores de polinização favorecer a reprodução entre indivíduos mais próximos, pode ocorrer o cruzamento entre indivíduos aparentados, gerando endogamia na descendência. Em um estudo sobre a estrutura e diversidade genética espacial de *Eschweleira ovata* (Lecythidaceae), Gusson e col. (2005) observaram que muitas sementes são depositadas na vizinhança das árvores maternas, apesar de ainda não conhecerem os dispersores das sementes desta espécie. No entanto, é sabido que outras espécies da mesma família indicam que essas costumam ser dispersas por morcegos, aves e pequenos roedores (Stevenson, 2001).

Gaiotto e col. (2003) utilizaram marcadores microssatélites para se estimar a estrutura populacional, sistema de acasalamento e realizar teste de paternidade na espécie *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae). A polinização é mediada por abelhas e pelo vento. Foi observada uma alta taxa de fluxo gênico entre indivíduos distantes até 22 Km, sendo por isso, considerado o maior evento de dispersão de fluxo gênico até então evidenciado para uma espécie tropical.

Ward e col. (2005) revisaram dados da literatura que examinam estudos baseados em marcadores moleculares, como aloenzimas e microssatélites, com o objetivo de quantificar sistemas de cruzamento e dispersão de pólen em espécies neotropicais. Foi visto que a polinização de espécies neotropicais é variável, e incluem grandes e pequenos insetos (Bawa e col., 1985), beija-flores (Degen e col., 2004),

morcegos (Murawiski e Hamrick, 1991), e vento (mais raro) (Alvarez-Buylla e Garray, 1994).

Segundo Hamrick e Loveless (1986), são vários os mecanismos de dispersão de sementes, sendo que os mais interessantes para a compreensão da estrutura de diversidade genética em *C. brasiliense* são: a dispersão por gravidade, por animais e pela água. As espécies que possuem as sementes dispersas apenas pela gravidade geralmente apresentam habilidade de dispersão limitada. Desta forma, níveis intermediários de diversidade genética devem ser mantidos dentro das populações e, assim, altos níveis de diferenciação são encontrados entre as populações e, com isso, a estrutura genética dentro das populações deve ser pronunciada.

A dispersão de pólen e sementes promove o fluxo gênico nas plantas, que é um importante componente da estrutura genética das espécies, pois reduz a divergência genética entre as populações (Nason e col., 1997). Segundo Wright (1943), populações separadas por longas distâncias e com limitado fluxo gênico podem tornar-se diferenciadas geneticamente uma das outras pelo processo de “isolamento por distância”. Hamrick e Loveless (1989), afirmam que populações de espécies cuja polinização é mediada por animais que percorrem longas distâncias, apresentam maior diversidade genética que aquelas polinizadas pelo vento ou animais que percorrem curtas distâncias, onde o fluxo gênico é limitado. Já a dispersão das sementes pelo vento ou por animais apresenta maior diversidade genética dentro das populações que a dispersão por barocoria. Estrada e Fleming (1986) apontam para a alta taxa de dispersão zoocórica de sementes nos ambientes tipicamente tropicais. Se os vetores de dispersão de sementes não forem suficientemente eficientes muitas das sementes podem ser dispersas nas vizinhanças das árvores maternas, dando origem a uma

estruturação genética espacial, onde indivíduos próximos tendem a serem mais semelhantes entre si do que indivíduos espacialmente mais distantes. Isto gera uma distribuição não aleatória de genótipos dentro das populações, caracterizada por manchas, onde a frequência de certos alelos é maior do que seria esperado pela casualidade.

Segundo Fleming (1981), as espécies que têm como principal agente dispersor o morcego, apresentam padrão de distribuição agregado, em moitas. Em *C. pentandra*, foi observado que morcegos carregavam o pólen para distâncias maiores que 5 Km, e a distância máxima de 18,6 Km já observada (Gribel, citado em Wilson e col., 2001). De acordo com Figliolia e Kageyama, (1995) os frugívoros são imprescindíveis como agentes efetivos na dispersão de sementes, levando-as a longas distâncias, e possibilitando a regeneração e colonização de outras áreas. Fischer e Santos (2001) verificaram que as sementes de *C. brasiliense* são dispersas por gravidade e por morcegos pertencentes ao gênero *Artibeus*. Estes se alimentam da polpa dos frutos e descartam as sementes sob os locais de alimentação (Sazima e col., 1994). Foi observado também que as sementes podem ser secundariamente dispersas pela água e, neste caso, são carregadas ao longo dos córregos dos rios (Fisher, 1997). De acordo com Mello e col. (2005), em estudo na restinga do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, São Paulo, os morcegos deste gênero removem os frutos e consomem somente a polpa de *C. brasiliense*, agindo como legítimos dispersores de sementes. Apesar de muitos frutos terem sido jogados em baixo da árvore parental, alguns deles também foram encontrados mais distantes. Marques (1994) observou que a escarificação dos frutos pelos morcegos, pode acelerar o processo germinativo.

A dispersão de sementes pela água também pode assumir uma grande importância para a distribuição dos indivíduos da população. Geralmente, espécies de locais alagados apresentam características especiais de adaptação que permitem a sua sobrevivência, e uma delas, é a capacidade de suas sementes flutuarem (Morton e Hogg, 1989; Barrat-Segretain, 1996). Cada espécie apresenta um padrão de flutuação das sementes, e isso influencia na deposição e capacidade de colonizar novos ambientes. No caso da *C. brasiliense*, as sementes são capazes de permanecerem viáveis por até três meses quando submersas ou enterradas no solo (Marques & Joly, 2000). As sementes de *Taxodium distichum* e *Nyssa aquatica* são também capazes de flutuarem e de permanecerem viáveis por 2-3 meses (Schneider e Sharitz, 1988). Russel e col. (1999) estudaram a espécie *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae), uma planta pioneira encontrada em locais alagados na Bacia Amazônica. Suas sementes são capazes de permanecerem viáveis por vários dias na água. Com o intuito de observar o papel da hidrocoria em mediar o fluxo gênico, foram amostradas populações ao longo do rio Amazonas na parte Peruana. No entanto, nenhuma evidência foi observada no papel da água como grande dispersor das sementes. Em um estudo sobre a história biogeográfica da espécie *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), típica de locais alagados, Riveira-Ocasio e col. (2002) constataram a rota de colonização desta espécie desde a África até o Caribe durante o período Quaternário. Como as sementes são capazes de flutuar e são tolerantes à água salina, a colonização se deu da costa oeste da África, com a corrente de Benguela até a costa nordeste do Brasil. A partir daí, uma outra corrente permitiu que a colonização desta espécie chegasse até a costa do Caribe. Com isso, puderam inferir possíveis dispersões a longas distâncias, já que as sementes da espécie possuem características

que permitam a sobrevivência após longos períodos na água. Tal estudo ilustra como a característica apresentada pela semente pode contribuir para um padrão e história de dispersão de uma dada espécie.

A nível populacional, apesar da influência de fatores locais, tais como variação espacial da distribuição das espécies e a seleção da variação de microhabitats (Levin e Kerster, 1974; Epperson, 1993; Doligez e *col.*, 1998; Degen e *col.*, 2001a; Cavers e *col.*, 2005), a estruturação genética espacial é consequência de uma limitada dispersão de pólen e sementes (Epperson e Li, 1997; Doligez e *col.*, 1998; Degen e *col.*, 2001a; Epperson, 2004; Vekemans e Hardy, 2004).

### **1.3.2 Marcadores moleculares para o estudo da diversidade**

Existem muitas maneiras de acessar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma determinada espécie. Técnicas de biologia molecular permitem hoje a observação de polimorfismo diretamente na seqüência gênica de organismos. Os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies e biologia populacional como um todo, e têm sido largamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (Zucchi, 2002). Os dados gerados por pesquisas em genética de populações podem ser utilizados para definir unidades de conservação e prioridade para o manejo de recursos genéticos, indicando áreas e populações de maior e menor importância para a preservação dos táxons em questão e permitindo o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação.

Os primeiros marcadores moleculares foram desenvolvidos na década de 60. Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis atualmente, os marcadores AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (Vos e *col.*, 1995) mostram-se uma ferramenta poderosa para a análise da diversidade genética molecular em populações naturais de plantas. A técnica é simples e aplicável a qualquer organismo, uma vez que não é necessário o conhecimento prévio da seqüência do DNA. Os AFLPs combinam especificidade, resolução e poder de amostragem de digestão com enzimas de restrição com velocidade, podendo ser facilmente identificados através de PCR. A técnica de AFLP pode ser realizada em três etapas: Primeiramente, ocorre a clivagem do DNA com duas enzimas de restrição; a segunda etapa consiste na ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos gerados pelo corte do DNA total, e posterior amplificação desses fragmentos por PCR utilizando-se iniciadores que reconhecem os adaptadores. Além de possuírem uma seqüência complementar a dos adaptadores, estes iniciadores possuem de um a quatro nucleotídeos arbitrários a mais na sua extremidade 3’. Estes nucleotídeos servem para selecionar, dentre todos os fragmentos resultantes da clivagem do DNA, quais serão amplificados. Desta forma, o número de fragmentos é viável para posterior análise. Os fragmentos obtidos podem ser posteriormente analisados em um gel de poliacrilamida separados por eletroforese, ou analisados através de eletroferogramas. As principais vantagens do AFLP são:

- i) Não é necessário conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos a ser estudada;
- ii) Dentre todos os marcadores disponíveis é o capaz de fornecer maior número de loci informativos;
- iii) Alta reprodutibilidade;



iv) Altamente polimórficos.

A maior limitação da técnica de AFLP é sua incapacidade de distinguir indivíduos heterozigotos de homozigotos. Por isso, AFLP é denominado marcador dominante, e, assim, pode ser menos informativo que marcadores codominantes. Conseqüentemente é necessário assumir que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não sendo possível estimar a freqüência de um alelo particular numa população. Porém, a estrutura genética de populações têm sido tradicionalmente estudada através dos desvios na freqüência alélica em relação ao esperado nas populações panmíticas (Excoffier e col., 1992), isto é, para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os marcadores AFLP têm sido recentemente empregados na descrição da estrutura genética populacional de diversas espécies tropicais como, por exemplo, para *Eugenia uniflora* (Margis e col., 2002), *Cedrela odorata* (Cavers e col., 2003), *Euterpe edulis* (Cardoso e col., 2000), *Pterocarpus officinalis* (Rivera-Ocasio e col., 2002) e *Calycophyllum spruceanum* (Russel e col., 1999). No entanto, ainda são poucos os estudos que utilizam marcadores AFLP para descrever a diversidade genética de populações naturais de espécies tropicais (Cardoso e col., 1998; Newton e col. 1999; Margis e col., 2002).

## 2. Objetivo

Este trabalho teve por objetivo geral caracterizar a diversidade genética em populações de *Calophyllum brasiliense* utilizando marcadores de DNA do tipo AFLP, visando assim contribuir para a definição de estratégias de conservação para a espécie.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Quantificar os parâmetros de diversidade genética em quatro populações de *C. brasiliense* com base na análise de polimorfismos de AFLP.
- 2) Caracterizar os padrões de distribuição da variabilidade genética e o nível de diferenciação entre populações de *C. brasiliense*.
- 3) Determinar a estrutura genética espacial em duas populações de *C. brasiliense*, correlacionando distância genética e distância euclidiana.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Áreas de coleta

Para este estudo foram amostradas populações naturais de *C. brasiliense*, procurando abranger grande parte de sua área de ocorrência. Foram definidas para a coleta das amostras, a região Sudeste e a Amazônia, no Brasil, e Costa Rica (América Central) (figura 5). A região Sudeste está representada por duas localidades: Macaé (Rio de Janeiro) e Tiradentes (Minas Gerais). As amostras da Floresta Amazônica, no município de Oriximiná (Pará) e, por último as amostras provenientes do Distrito de Guápiles, Costa Rica. A distância geográfica entre essas populações variou de 300 Km a 5400 Km.



Figura 5: Mapa ilustrativo dos locais de coleta. 1: Guápiles (Costa Rica ); 2: Oriximiná (PA); 3: Tiradentes (MG); e 4: Macaé (RJ). Foto obtida pelo programa Worldwind ([www.world.arc.nasa.gov](http://www.world.arc.nasa.gov)).

Macaé (RJ) constitui uma área de restinga dentro do domínio do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. O Parque foi criado por lei federal em 1998, tornando-se a primeira unidade de conservação em restinga do país, compreendendo os municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã (22°-22°23'S; 41°15'-41°45'W) e possui uma extensão de 14,860 hectares e está localizada a aproximadamente 200 Km a nordeste da cidade do Rio de Janeiro (figura 6). O Parque engloba uma vegetação local em mosaico, conhecida como Restinga (Lacerda e col. 1993; Scarano 2002), a qual está situada em terreno com formação Quaternária. Os solos são basicamente do tipo regossolo, sendo também encontrados solos salinos e orgânicos. O clima é tropical com temperatura média anual de 25 °C, e com índices pluviométricos 1164 mm anuais, com período chuvoso marcante no verão (Novembro – Fevereiro). Diferente de muitas outras regiões arenosas costeiras no Rio de Janeiro, devido à justaposição sucessiva de depósitos arenosos paralelos à costa, a planície de Jurubatiba consiste em uma série de rios paralelos estreitos que intermeiam o parque, e tem origem no Pleistoceno (120.000 anos) formados pelo assoreamento de sedimentos marinhos, formando assim diversas lagoas (Henriques e col. 1986). Os rios atingem até 10 km de extensão. Na costa brasileira ocorreram três movimentos sucessivos de transgressões marinhas durante o Holoceno (cerca de 5.100 anos antes do presente (AP), 3900-3600 anos AP, 2700-2500 anos AP) seguidos por regressões (Martin e col., 1989). No entanto, na costa fluminense o comprimento da transgressão foi progressivamente menor e, aparentemente não destruiu completamente os rios da época do Pleistoceno. O ambiente de restinga é caracterizado pela grande heterogeneidade verificada na vegetação. As áreas úmidas ou inundadas são compostas principalmente por *Calophyllum brasiliense* Cambess e *Symphonia globulifera* L.f. (ambas Clusiaceae),

típicas desses locais inundados e são encontradas em outros locais do Brasil; algumas espécies também tolerantes à inundação, mas com distribui o mais restrita   região Sudeste do país, como *Tabebuia cassinoides* (Lam) D.C. (Bignoneaceae); e outras espécies menos abundantes, cuja origem   da Mata Atlântica (Scarano, 2002).

As regiões alagadas são extensões estreitas de vegeta o que permanecem periodicamente ou permanentemente alagadas, dependendo da topografia (Araujo e col. 1998). Além desses locais alagados, outros tipos de vegeta es são encontrados como vegeta o costeira e arbustos, e florestas densas.

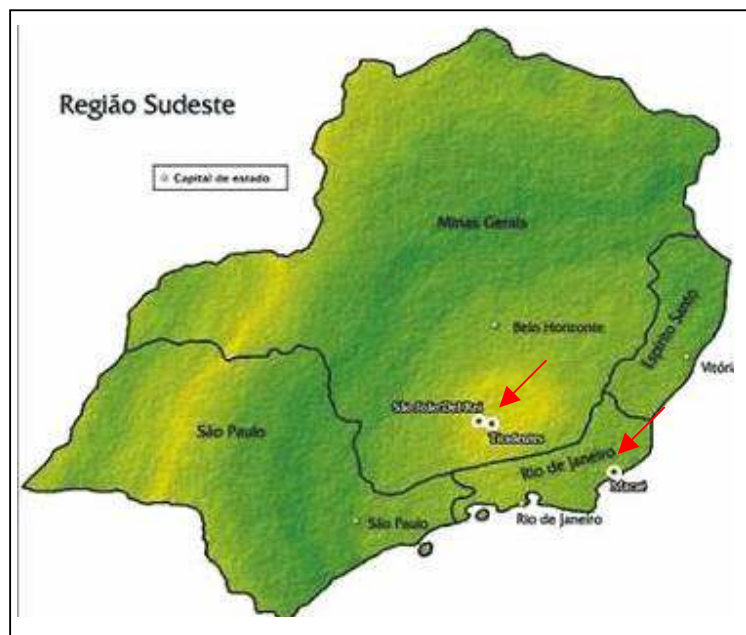


Figura 6: Mapa ilustrativo mostrando as cidades de Tiradentes e Macaé (indicadas pela seta vermelha), na região Sudeste do Brasil.

A segunda população do sudeste foi coletada na serra de São José no município de Tiradentes (MG) (figura 6). Tiradentes está situada a aproximadamente 900 metros acima do nível médio do mar na latitude de 21°S e 44°W, possui um regime de chuva mais intensas no verão e escassas no inverno. Em Janeiro, a temperatura média gira em torno de 23 °C, e quando da presença das massas de ar úmido favorecem a ocorrência de pancadas de chuva que chegam a totalizar a altura de 265 mm.

A Serra de São José ocupa uma faixa de cerca de 2 km de largura, correndo de Sudoeste a Nordeste por 15 quilômetros, fazendo parte dos municípios de Tiradentes, São João Del Rey, Prados, e Lagoa Dourada, e eleva-se a partir de 900 metros acima do nível do mar. A vertente sul é íngreme, caindo suas colinas abruptamente na mata de cerrado, relativamente densa, com uma rica fauna e flora. O lado norte liga a Serra por meio de escarpas mais suaves (inclinações de 45 a 55 graus, em média) aos latossolos do antigo cerrado, atualmente em grande parte transformados em lavouras. O topo da Serra tem topografia relativamente plana (tabular), interrompido esparsamente por afloramentos rochosos, formando terraços pelos quais é possível atravessar praticamente toda a sua extensão a pé. O platô e as encostas são ocupados por um mosaico de comunidades vegetais cujo conjunto caracteriza os campos rupestres. Estas comunidades crescem sobre areia e cascalho resultantes da degradação do quartzito e sobre as rochas. Os afloramentos rochosos da Serra são compostos principalmente por quartzitos metaconglomerados, com um aspecto cáustico produzido pela erosão diferencial. No vale do Córrego do Mangue, há um depósito de ardósia branca, já decomposta e pastosa e de esteatita rosada (pedra sabão). A Serra é ainda caracterizada por possuir diferentes tipos de vegetação, dentre eles o cerrado, campo rupestre (Alves, 1991) e matas de galeria. Esta última geralmente encontra-se

confinada aos fundos dos vales que definem seus limites e é caracterizada por apresentar uma vegetação associada aos córregos dos rios.

A espécie *C. brasiliense* está restrita aos ambientes de mata de galeria, na qual os períodos de inundações são constantes durante as estações chuvosas (novembro a fevereiro). As amostras foram coletadas na localidade conhecida como “Cachoeira do Mangue”, onde são encontradas em solos inundados e campos rupestres ao longo do curso do rio.

O Distrito de Porto Trombetas (56° W 1° 40' S) no Município de Oriximiná está localizado na região Oeste do Pará, 100 Km a Oeste do rio Trombetas com o rio Amazonas (Lapa, 2000) (figura 7). O Município de Oriximiná é quase totalmente recoberto pela Floresta Densa, assumindo inúmeras variações de porte e composição, de acordo com a fisiografia, solos e teor de umidade. Entre essas feições ou subtipos, destacam-se a Floresta Densa dos platôs (altos e baixos), ao longo das margens do baixo curso do rio Trombetas; a Floresta Densa submontana em relevo aplainado, e em platô e relevo dissecado do Complexo Guianense e a Floresta Densa das baixas cadeias de montanhas. A temperatura do ar é sempre elevada, com média anual de 25,6 °C. A pluviosidade se aproxima dos 2.000 mm anuais. Entretanto, é um tanto irregular durante o ano. As estações chuvosas coincidem com os meses de dezembro a junho, e, as menos chuvosas, de julho a novembro.

A *C. brasiliense* é encontrada nas florestas fluviais alagadas (floresta de *igapó*), as quais estão ao alcance das enchentes anuais do rio Amazonas e de seus tributários mais próximos e, pode permanecer alagado por cerca de seis meses por ano. Um dos rios mais importantes é o Trombetas, no distrito de Oriximiná, estado do Pará. Este rio nasce na fronteira do Brasil com a Guiana e tem 750 Km de extensão. Possui águas

claras e apresenta baixo pH e pouca disponibilidade de nutrientes (Prance, 1979). O Governo Federal criou a Reserva Ecológica do Rio Trombetas com 3.850 Km<sup>2</sup> para a preservação da floresta e da fauna, já que a ação das grandes companhias as margens do rio têm produzido grandes clareiras. Quando se encontra com o rio Paraná de Sapucá, recebe o nome de baixo Trombetas e chega a atingir 1.800 m de largura. As amostras de *C. brasiliense* foram coletadas na margem direita do rio Trombetas, perto do Lago Batata (1°30'S, 56°20'W). As adaptações ecológicas das plantas características desses ambientes a essas severas condições foram revisadas por Parolin e col. 2004.

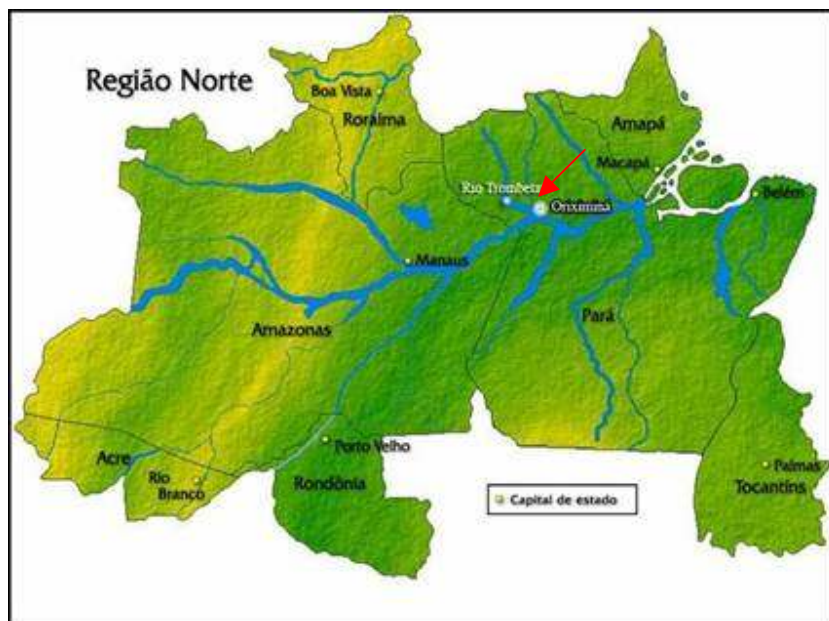


Figura 7: Mapa ilustrativo mostrando Oriximiná na região Norte do Brasil.



A Costa Rica localiza-se ao sul da América Central entre os paralelos 8°00'-11°00' N e meridianos 83°30'- 86°00' L, tendo o Panamá e a Nicarágua como países vizinhos a sudeste e a noroeste, e o Mar do Caribe e o Oceano Pacífico, a leste e a Oeste, respectivamente. A extensão territorial da Costa Rica é de 51.113 Km<sup>2</sup> sendo dividida em 7 províncias e 6 regiões climáticas denominadas Pacífico Sul, Zona Norte, Vale Central, Pacífico Central, Pacífico Norte e Vertente do Caribe que são delimitadas por aspectos físicos representados principalmente pelas cordilheiras (Mena, 2004). Essas regiões apresentam índices climáticos e tipos de solos distintos sendo o presente trabalho realizado na província de Límon, localizada na Costa do Caribe. As amostras de *C. brasiliense* foram coletadas no Distrito de Guápiles, cantón Pococí, num terreno próximo a propriedade Agropecuária de Corinto S.A, localizada aos pés da Cordilheira Vulcânica Central, do lado Atlântico (figura 8). Trata-se de uma floresta tropical úmida de uma extensão de 260 ha, dos quais 150 ha são cobertos por um bosque primário. Essa região ainda é dividida pelo rio Corinto, ao longo do qual a *C. brasiliense* é encontrada. A precipitação anual é 4.000 mm com temperatura média de 23°C. O terreno varia desde topografia plana a acidentada, e a altitude é de 235 a 325 m. Os solos são de origem vulcânicos e bastante ácidos.



Figura 8: Mapa da Costa Rica (Guápiles indicada pela seta).  
Fonte: Gillies e col., 1997, modificado.

### 3.2 Coleta do material vegetal

Para as análises de diversidade genética foi amostrado um total de 207 indivíduos nas quatro populações descritas.

Tabela 1: Populações, número de indivíduos e material coletados.

População	Sigla	Número de indivíduos	Material coletado	Latitude	Longitude
Costa Rica	CR	40	Câmbio	8°00' – 11°00'N	83°30' – 86°00' L
Oriximiná (PA)	PA	50	Folha	1° 40' S	56° W
Tiradentes(MG)	TR	39	Folha	21° S	44° W
Macaé (RJ)	MC	78	Folha	22°23'S	41°45'W

O número de indivíduos coletados em cada área de coleta variou como pode ser visto na tabela 1. O diâmetro a altura do peito (DAP) era de aproximadamente 20 cm. As plantas foram escolhidas aleatoriamente em cada área, respeitando um limite mínimo de distância de 10 m entre os indivíduos, totalizando um número de 207 amostras provenientes de quatro regiões distintas.

Folhas jovens foram coletadas, à exceção de Guápiles, onde foi coletado o câmbio. Estes materiais foram acondicionados, ainda no local de coleta, em tubos plásticos de 50 ml contendo sílica gel como agente dessecante (2,5 g/g de tecido foliar). A desidratação das amostras coletadas é importante para evitar a degradação do DNA por oxidação e/ou ação de DNAses. Uma vez no laboratório, o material foi estocado em freezer à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Visando um estudo da estrutura genética intrapopulacional, para as populações de Macaé e Costa Rica, também foi anotada a posição geográfica de cada indivíduo através do sistema de coordenadas por triangulação via satélites – GPS (Global Position System). As respectivas coordenadas geográficas estão representadas em um quadro no anexo 1. Foram coletadas folhas com boa saúde fitossanitária, que não apresentavam manchas em sua maioria, ou qualquer sinal de ataque de agentes patogênicos ou herbivoria. Desta forma, foi evitada uma eventual contaminação do DNA foliar extraído com DNA exógeno à planta.

### 3.3 Extração de DNA genômico

Para extração do DNA genômico das amostras, foi utilizado o protocolo baseado no uso do detergente CTAB (Doyle e Doyle, 1987). O tecido foliar congelado à  $-80^{\circ}\text{C}$  foi macerado com Nitrogênio líquido até produzir um pó fino. Em seguida, foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (2 % de CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA; 200 mM de Tris-HCl; 2 % de PVP; pH 8,0; 0,4 % de  $\beta$ -mercaptoetanol). A mistura foi agitada vigorosamente em agitador tipo vortex por 30 segundos e incubada à  $65^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, sendo agitada por inversão a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcoolisoamílico (24:1). A mistura foi agitada por inversão durante 5 minutos a 13000 rpm, à temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi transferida para tubo novo e a esta fase, foi adicionada 1/10 do volume de uma solução de 10 %CTAB, 1,4 M de NaCl. A mistura foi agitada até que homogeneizasse a solução. Após isso, a extração com clorofórmio-álcoolisoamílico foi repetida por mais três vezes. Após transferir a fase aquosa para um tubo novo, foi adicionada 2/3 do volume de solução aquosa (aproximadamente 400  $\mu\text{L}$ ) de isopropanol frio ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), e misturada por inversão para a precipitação dos ácidos nucleicos. O material foi incubado por 16 horas à  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi dispensada e o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70 % por 5 minutos e uma vez com etanol 100 % por mais 5 minutos. Após as lavagens, o precipitado foi seco à temperatura ambiente. O precipitado foi solubilizado em 50  $\mu\text{L}$  de água Milli Q<sup>®</sup> (filtrada no aparelho Ultra Pure Water System da Milli Q<sup>®</sup> e esterilizada em autoclave à 1,5 atmosfera de pressão à  $120^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos) contendo 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNase.

### 3.4 Quantificação do DNA

A concentração e a integridade do DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % a TAE 1x (Tris Base 24,3 g/L; ácido acético glacial 5,7 (P/V); EDTA 10 %; pH 8,0), e 1,2 µL/100 mL de tampão de brometo de etídeo, para posterior visualização do DNA extraído e dos DNAs padrões em um transiluminador utilizando luz ultravioleta. Foi utilizado para tal análise DNA padrão com massa molecular conhecida. Foram utilizados padrões contendo 25, 50, 100 e 200 ng do phago  $\lambda$ . Em 2 µL de cada amostra, foi adicionada 1 µL de tampão (0,025% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol FF e 30% de glicerol em água) e mais 8 µL de água Milli Q. As amostras foram aplicadas no gel e a migração eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V. Após, 10 minutos de migração eletroforética, o DNA foi observado em um transiluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada e fotografada (sistema EagleEye – Stratagene®).

### 3.5 Reações de AFLP

Todas as amostras das quatro populações de *C. brasiliense* estudadas foram analisadas utilizando-se marcadores do tipo AFLP (Vos e col., 1995). Dez combinações de enzimas/iniciadores já haviam sido testadas anteriormente para *C. brasiliense* em nosso laboratório. Quatro dessas combinações que apresentaram maior polimorfismo de bandas e resolução foram utilizadas para as análises (Eco-CC x Mse-GCAC/ Eco-CC x Mse-GACC/ Eco-CT x Mse-GCAC/ Eco-CT x Mse-GACC).

Inicialmente 15 ng do DNA genômico total foram digeridos com as enzimas 50 ng de *Eco* RI (5'AGACTGCGTACCAATTC 3') e 50 ng de *Mse* I (5'GAACGATGAGTCCTGAGTAA 3') Foram utilizadas 0,5 U de cada enzima e 2,0 µL do tampão 5 X "reaction buffer" (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM acetato de magnésio, 250 mM acetato de potássio) em volume final de 10 µL. A digestão ocorreu por 12 horas à 37 °C.

Após a digestão, os fragmentos foram ligados a adaptadores complementares aos sítios de clivagens. Foram utilizados 5 pmol dos adaptadores *Eco*RI e *Mse*I (5'AATT 3' e 5'TA 3', respectivamente), e 0,2 µL de T4 DNA ligase. A reação foi realizada num volume final de 5 µL incubada à 20 °C por 3 horas. Em seguida, a reação foi diluída numa proporção de 1:4, ou seja, para 15 µL de solução, foram adicionados 45 µL de TE, ficando a solução com um volume final de 60 µL.

Após isso, foi feita uma pré-amplificação seletiva dos fragmentos ligados aos adaptadores. Para um volume final de 20 µL, foram misturados: 5 µL do DNA digerido e ligado a adaptadores; 50 ng do iniciador *Eco* + oligo C; 50 ng do iniciador *Mse* + oligo G; 1 µL de dNTP 5 mM; 2 µL do tampão 10 X PCR (500 mM; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM e 5 U de Taq DNA polimerase. As etapas da reação de pré-amplificação foram: 94 °C por 30 segundos; 65 °C por 30 segundos. Nesta etapa, a cada ciclo a temperatura de pareamento baixa 0,7 °C até atingir a temperatura de 56 °C; 72 °C por 60 segundos; 94 °C por 30 segundos; 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos. Nesta etapa com as três últimas variações de temperatura, repete-se 23 vezes.

Para restringir ainda mais o número de fragmentos, foi feita uma última reação de PCR. Os iniciadores marcados com fluorocromo (Invitrogen®) são: *Eco*RI + fam (6-

carboxifluoresceína), o qual corresponde à combinação EcoRI + CC (5'AGACTGCGTACCAATTCCC) conferindo cor azul, e MseI + hex (hexaclorofluoresceína), correspondente à combinação EcoRI + CT (5'AGACTGCGTACCAATTCCCT), conferindo uma cor verde. E, iniciadores não marcados, complementares aos adaptadores *Mse* I, com as bases seletivas GCAC e GACC. Para um volume final de 12,5 µL, foram misturados: 1 µL do tampão 10 X PCR; 5U/ µL da enzima Taq DNA polimerase; 0,4 µL do *Mse* I; 0,2 µL de dNTP 5 mM; e 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM. As condições das reações de PCR para esta segunda etapa de amplificação foram as mesmas utilizadas anteriormente na etapa de pré-amplificação. Ao final da reação, é acrescentado 0,35 µL do marcador de peso molecular (GeneScan™ -500 LIZ® Size Standard), que possui amplitude de 35 a 500 pb, e 9,65 µL de um tampão contendo formamida (98% formamida, 10 mM EDTA pH 8,0; 0,1% de azul de bromofenol e xilenocianol).

### **3.6 Análise dos fragmentos AFLP**

A análise dos fragmentos obtidos foi realizada em um seqüenciador automático ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, por meio de eletroforese em capilares. O sistema de sequenciamento por fluorescência possui 16 capilares de 50 cm e permite a análise de 192 amostras em seqüência contínua. As amostras anteriormente misturadas a formamida e ao padrão interno foram aplicadas numa placa própria do aparelho. Cabe ressaltar que é possível analisar duas combinações de primer/enzima de uma só vez. Cada fragmento do DNA é marcado com um fluorocromo próprio, o que resulta em picos de pesos moleculares diferentes.

A estimativa dos fragmentos foi feita utilizando-se o programa Gene Mapper versão 3,5, Applied Biosystem. Este programa permite a detecção e a estimativa do tamanho dos fragmentos AFLP gerados para cada amostra. O resultado é apresentado na forma de eletroferogramas e, sendo que os picos correspondem aos tamanhos dos fragmentos amplificados. Os dados são posteriormente exportados para uma planilha do programa Excel da Microsoft, disponibilizando os dados para as análises genéticas em outros programas. Cada fragmento observado foi considerado um loco. Para a presença de cada fragmento (banda) atribuiu-se o valor “1”, e à ausência do mesmo o valor “0”. Desta forma, foram construídas matrizes binárias básicas que serviram para a análise dos dados.

### **3.7 Análise dos dados**

As análises genéticas foram realizadas a partir dos dados obtidos com as quatro combinações de iniciador/enzima descritos anteriormente.

#### **3.7.1 Diversidade genética**

A percentagem de *loci* polimórficos e heterozigosidade esperada (Nei, 1978) foram estimadas utilizando-se o programa TFPGA (Tool for Population and Genetic Analysis) (Miller, 1997), onde foi assumido o Equilíbrio de Hardy-Weinberg devido à característica dominante do marcador utilizado neste trabalho.



### **3.7.2 Análise da distância genética**

O programa TFPGA também foi empregado para a obtenção das análises da distância genética. As estimativas das distâncias e identidades genéticas foram realizadas utilizando-se o método da distância genética de Nei (1978) e o teste de bootstrap com 5000 replicações.

### **3.7.3 Distribuição da variabilidade genética**

As análises sobre a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações foram realizadas por meio de uma Análise da Variância Molecular com o auxílio do programa Arlequin (versão 3.0b, Excoffier & Schneider, 2005) com 5 % de tolerância para dados faltantes e com dois níveis hierárquicos distintos: diferença entre populações e dentro das populações. A significância da diferenciação foi testada com 1000 permutações, onde  $P$  denota a probabilidade de se observar um valor ao acaso igual ou maior ao valor observado.

### **3.7.4 Estrutura genética espacial**

A análise da estrutura genética espacial foi realizada para as populações de Macaé e da Costa Rica, correlacionando distância genética e distância euclidiana (em metros) entre os indivíduos mapeados dentro de cada população. Para tal, utilizou-se o programa SGS "Spatial Genetic Software" (Degen e col. 2001,b). A distância genética estimada entre os indivíduos foi a distância genética de Tanimoto com 1000 replicações baseado na simulação de Monte Carlo, com 95% de intervalo de confiança.

## **4 Resultados**

### **4.1 Extração de DNA**

O protocolo de extração de DNA utilizado, utilizando o detergente CTAB, mostrou-se eficiente para todas as populações de *C. brasiliense* analisadas. Foi possível extrair o DNA genômico total das amostras analisadas em quantidade e qualidade satisfatórias. O rendimento das extrações variou entre 12,5 a 100  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  de DNA, permitindo uma boa amplificação das amostras para as análises de AFLP.

### **4.2 Diversidade genética**

As reações de AFLP utilizando-se quatro combinações de iniciadores (EcoRI + 2 / MseI+ 4) revelaram 519 *loci* nas amostras de *C. brasiliense* para as quatro populações amostradas. A média de *loci* polimórficos foi de 58,7 %, 88,9 %, 55,9 % e 75,7 % para respectivamente para as populações do Oriximiná (PA), Guápiles (Costa Rica), Macaé (RJ) e Tiradentes (MG). Quando todos os indivíduos dessas quatro populações são considerados em conjunto, o nível de polimorfismo para cada par de iniciadores variou de 55,9 a 91,1 % (tabela 2).

Tabela 2: Estimativas de diversidade genética em populações de *C. brasiliense*: número total de *loci* AFLP, porcentagem de *loci* polimórficos, *He* (heterozigosidade média esperada por população) e *Ht* (heterozigosidade média esperada total).

Iniciadores Eco+2/Ms e+4	Nº total de <i>loci</i>	% de <i>loci</i> polimórficos				<i>He</i>				<i>Ht</i>
		PA (n =50)	CR (n =40)	MC (n = 78)	TR (n = 39)	PA	CR	MC	TR	
CC/GCAC	93	48,4	67,7	55,9	60,2	0,16	0,22	0,19	0,20	0,23
CC/GACC	117	50,4	97,4	51,3	71,8	0,12	0,26	0,19	0,22	0,22
CT/GCAC	135	39,3	90,4	70,3	77,8	0,11	0,29	0,25	0,26	0,26
CT/GACC	174	96,6	100	55,2	93,1	0,31	0,44	0,20	0,27	0,33
TOTAL	519	62,6	91,1	55,9	78,4	0,19	0,32	0,21	0,25	0,27

PA, CR, MC e TR correspondem ao Pará, Costa Rica, Macaé e Tiradentes, respectivamente; n = número de indivíduos.

As heterozigosidades médias esperadas para cada população variou de 0,19 a 0,32, considerando-se todos os *loci* detectados a partir dos quatro pares de iniciadores utilizados. A heterozigosidade média esperada para todas as populações em conjunto foi (*Ht*) foi de 0,27.

### 4.3 Diferenciação genética

O nível de divergência entre as quatro populações, estimado pelo índice *Fst* foi de  $0,26 \pm 0,01$  verificando-se que a maior parte da diversidade encontra-se dentro de cada população. Quando o *Fst* é analisado par a par (tabela 3), observa-se que os valores não divergiram muito entre as populações, à exceção de Tiradentes e Oriximiná, que apresentaram o menor valor de estruturação.

Tabela 3: Estimativa de *Fst* analisada par a par obtidas para quatro populações de *C. brasiliense*.

Populações	Oriximiná (PA)	Guápiles (CR)	Macaé (RJ)	Tiradentes (MG)
<b>Oriximiná</b>	-----	-----	-----	-----
<b>Guápiles</b>	0,24 ( $\pm 0,01$ )	-----	-----	-----
<b>Macaé</b>	0,27 ( $\pm 0,01$ )	0,27( $\pm 0,01$ )	-----	-----
<b>Tiradentes</b>	0,17 ( $\pm 0,01$ )	0,26 ( $\pm 0,01$ )	0,28 ( $\pm 0,01$ )	-----

( ) erro padrão.

A despeito das distâncias geográficas entre as populações analisadas, Tiradentes e Oriximiná apresentam a menor distância genética quando comparado com as outras populações. O resultados das distâncias genéticas obtidas pelo método de Nei (1978) podem ser vistos no dendrograma a seguir (figura 9). Esses valores corroboram com os dados obtidos nas comparações feitas com o *Fst*.

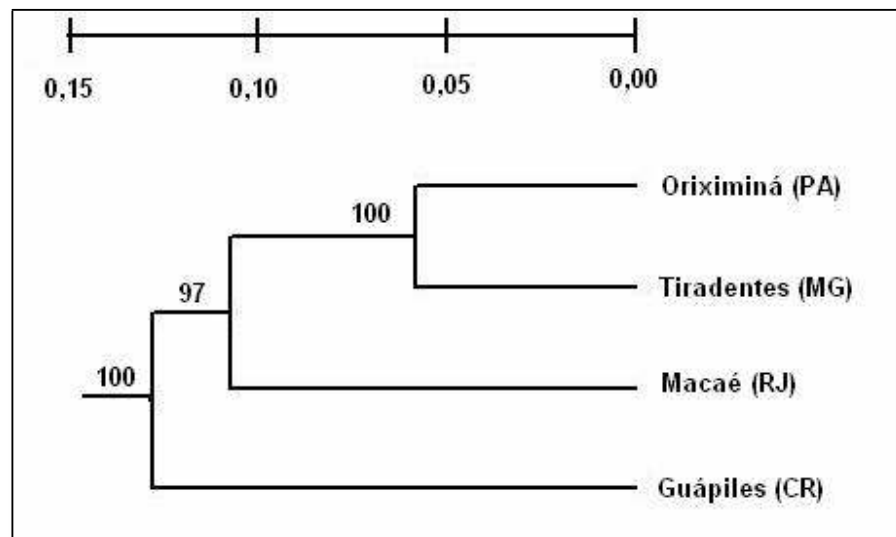


Figura 9: Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978) para as quatro populações de *C. brasiliense* utilizando 519 loci AFLP.

#### 4.4 Distribuição da variabilidade genética e diferenciação entre as populações

Com relação à AMOVA, a análise detectou diversidade genética molecular altamente significativa ( $P < 0,001$ ) tanto entre as populações quanto dentro das populações. Do total da variabilidade genética molecular encontrada para as populações analisadas de *C. brasiliense*, 34,7 % se deve à variação entre as populações, enquanto que 65,3 % é atribuída à variabilidade dentro das populações.

Tabela 4: Distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de *C. brasiliense* com base na análise de variância molecular (AMOVA).

Fonte de variação	G.L *	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem da variação	P
Entre populações	4	5970.927	35.72837	34.7	<0,001
Dentre as populações	202	13596.232	67.30808	65.3	<0,001
Total	206	19567.159	103.03645		

\* Graus de liberdade; P: *P-value*.

#### 4.5 Estrutura genética espacial

Baseado nas coordenadas geográficas, a localização espacial dos indivíduos das populações de Guápiles (Costa Rica) e Macaé (RJ) foi identificada em um mapa. Para cada população, a estrutura genética intrapopulacional foi analisada comparando as distâncias espacial e genética entre os indivíduos. A distância genética entre os indivíduos foi calculada utilizando-se os 519 *loci* polimórficos revelados através das quatro combinações de AFLP utilizadas no trabalho, nos 40 indivíduos coletados em Guápiles, e nos 78 indivíduos de Macaé, a partir dos quais, a exata localização foi obtida.

A análise da distância espacial *versus* distância genética foi feita com o auxílio do programa SGS. Nesta análise, uma determinada classe de distância espacial é escolhida e os indivíduos que se encontram dentro dessas classes de distância espacial são identificados. A amostragem dos indivíduos deve garantir que um número suficiente de comparações seja produzido em cada classe de distância, com o objetivo de gerar um valor significativo estatisticamente. Neste caso, um mínimo de 30 pares por classe de distância é recomendado (Degen *e col.*, 2001b; Cavers *e col.*, 2005). A partir daí, a distância genética média entre os pares de indivíduos classificados em cada classe de distância espacial é comparada com a distância genética esperada para uma população panmítica. Neste trabalho, as classes estabelecidas foram de 50 m em 50 m,

A figura 10 mostra a distribuição espacial dos indivíduos de Guápiles. O histograma obtido das análises baseadas nos 519 *loci* é mostrado na figura 11B, e neste caso, não há estruturação genética. Este dado pôde ser observado para cada uma das combinações AFLP separadamente. A figura 11A representa análise de comparação entre pares de indivíduos por classes de distância espacial.

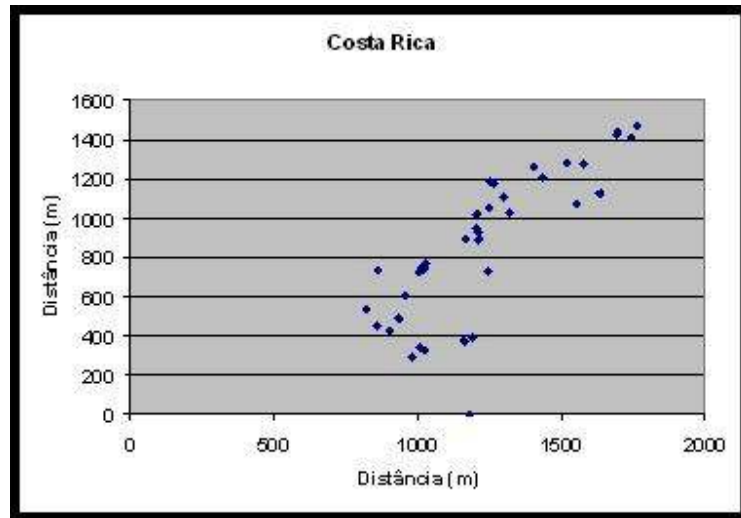
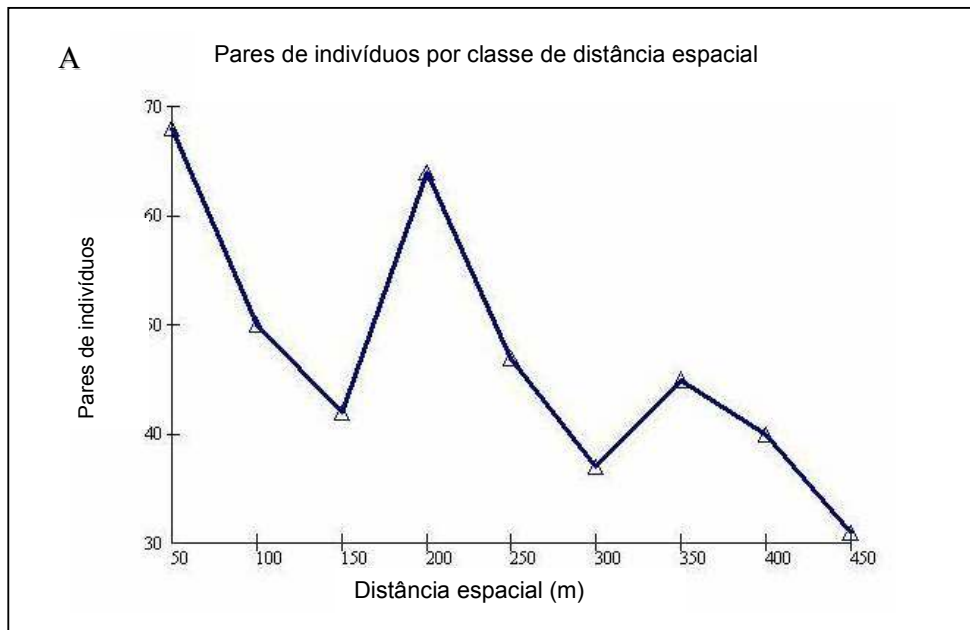


Figura 10: Distribuição espacial dos indivíduos de *C. brasiliense* da população de Guápiles (Costa Rica).



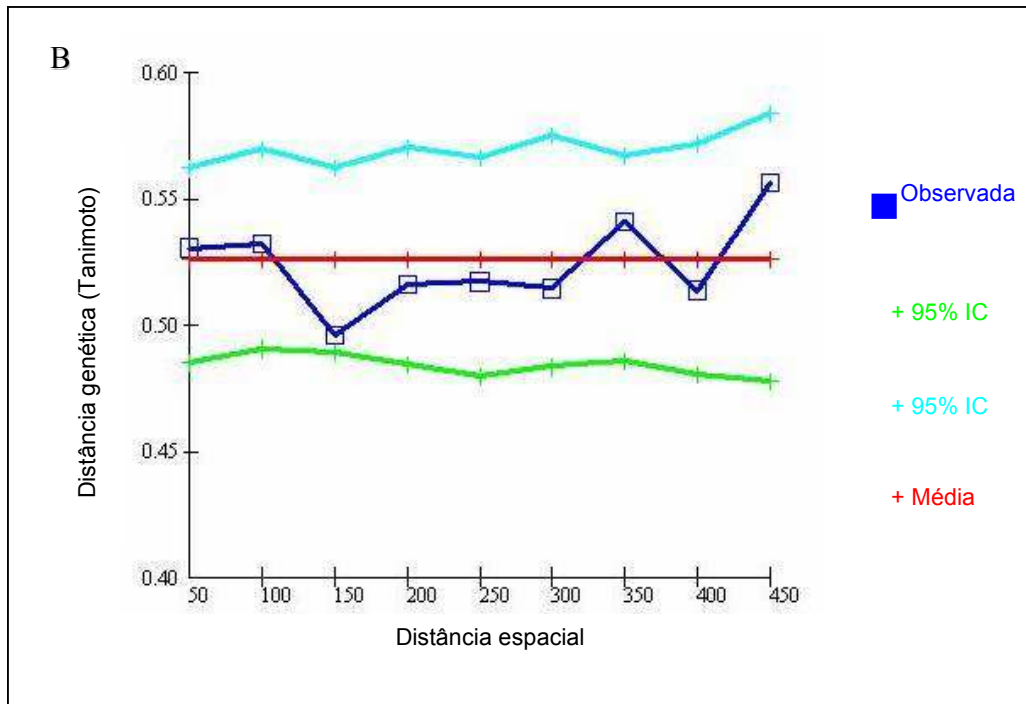


Figura 11: Resultado das análises de estrutura genética espacial entre os 40 indivíduos coletados em Guápiles com base nos 519 loci. (A) – Gráfico das análises de pares de indivíduos por classe de distância espacial; (B) – Distograma (--) distância genética média observada entre todos os pares de indivíduos da população; (--) distância genética média observada para todos os pares de indivíduos compreendidos em uma determinada classe de distância espacial; (– e –) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%).

O mesmo procedimento foi conduzido para a população de Macaé. A figura 12A representa o número de combinações encontradas por cada classe de distância espacial. Nota-se que o mínimo de 30 pares por classe de distância foi respeitado, e com isso, os resultados obtidos são válidos. Pode-se observar uma correlação positiva entre a distância genética e espacial para os indivíduos distantes até 75, aproximadamente uns dos outros. Neste caso, a distância genética observada é menor do que a esperada para uma população panmítica (figura 12B).



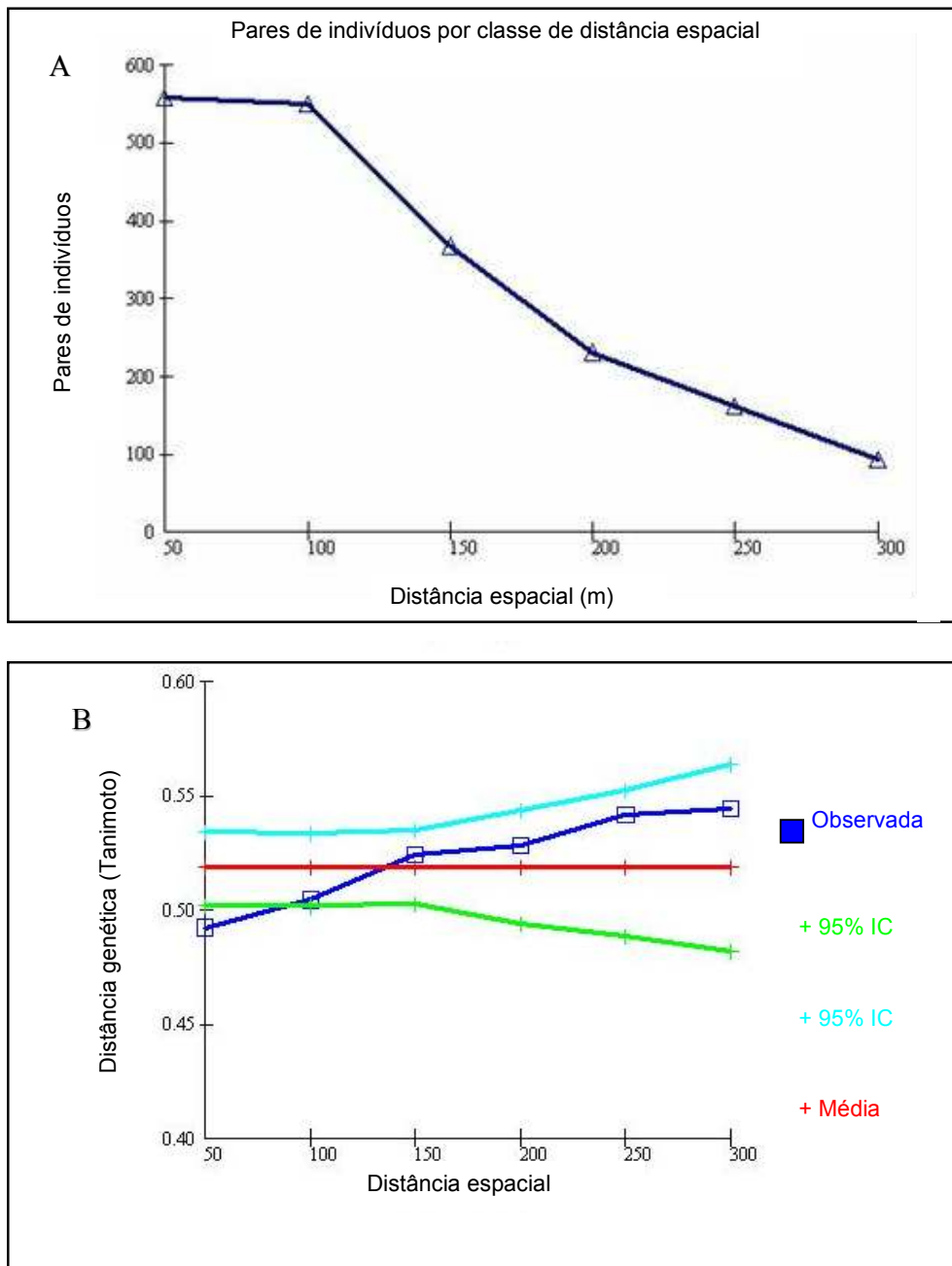


Figura 12: Resultado das análises de estrutura genética espacial entre os 78 indivíduos coletados em Macaé, com base nos 519 loci. (A) – Gráfico das análises de pares de indivíduos por classe de distância espacial; (B) – Distograma (--) distância genética média observada entre todos os pares de indivíduos da população; (--) distância genética média observada para todos os pares de indivíduos compreendidos em uma determinada classe de distância espacial; (--) e (--) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%).

Buscando compreender melhor o padrão de distribuição da espécie, foi feita uma segunda análise de estrutura genética espacial. A figura 13 é representada pelas duas subpopulações de Macaé, as quais estão distantes 3 Km.

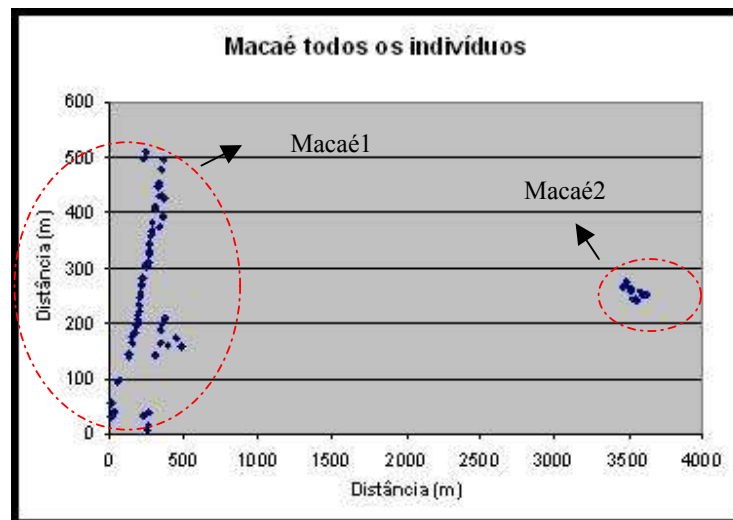


Figura 13: Distribuição espacial dos indivíduos de *C. brasiliense* da população de Macaé (RJ).

No entanto, essas análises só foram feitas para a subpopulação de Macaé 1, com 63 indivíduos. A subpopulação de Macaé 2 apresenta um baixo número de indivíduos (15), não sendo, portanto, representativo e, sendo assim, foi retirada das análises.

Na figura 14B, pode-se observar que o resultado obtido para a subpopulação Macaé 1, parece repetir o resultado encontrado quando todos os indivíduos foram analisados como uma população única. Neste caso, foram estipuladas as mesmas classes de distâncias, e observa-se que a distância genética entre indivíduos distantes até 75 m é menor do que a esperada para uma população panmítica.

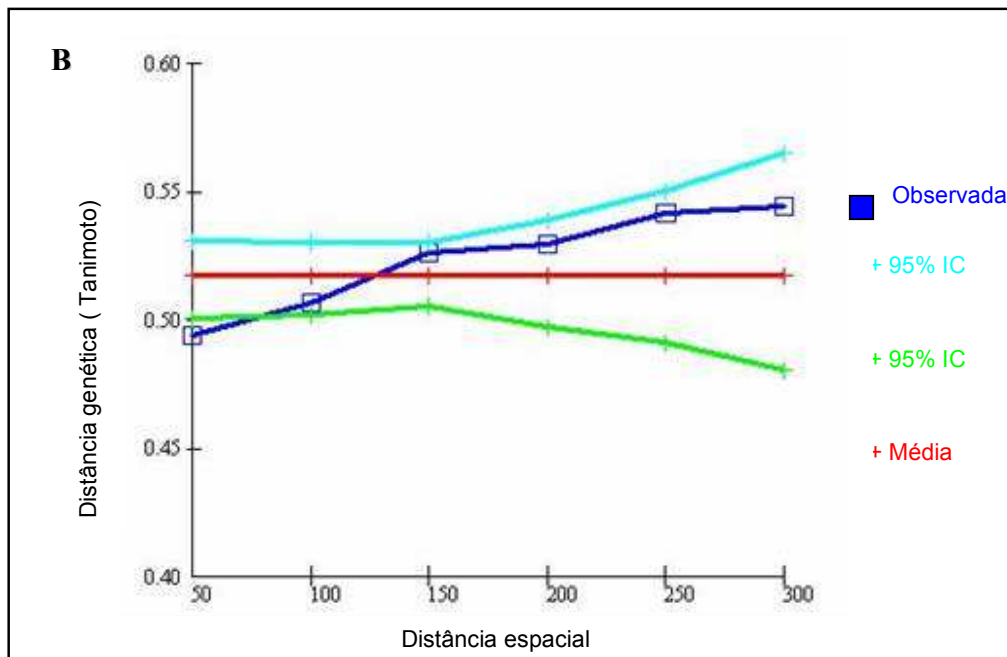
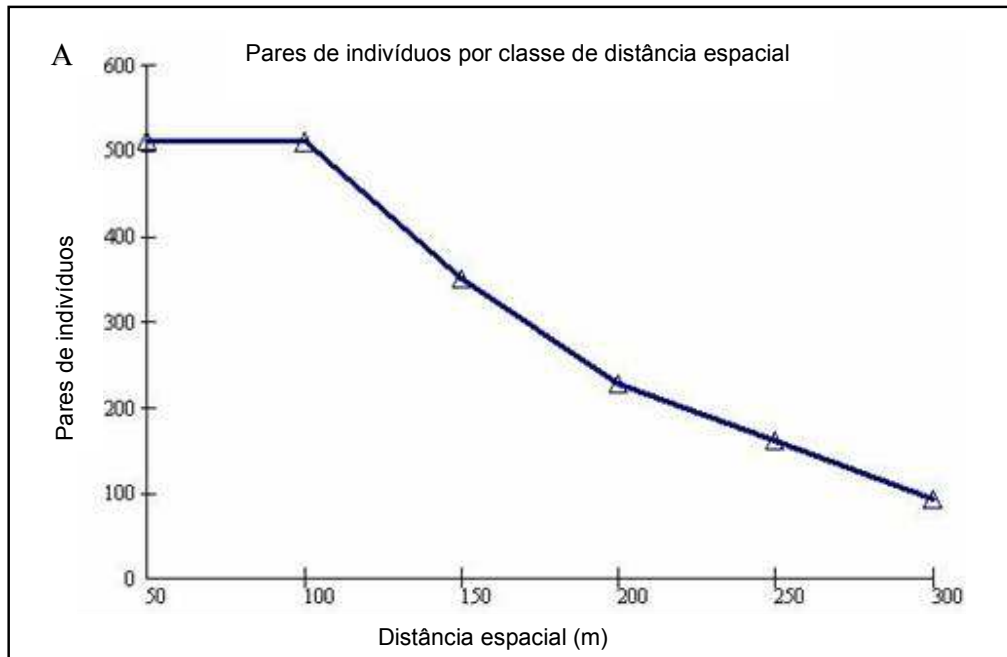


Figura 14: Resultado das análises de estrutura genética espacial entre os 63 indivíduos da subpopulação Macaé 1, com base nos 519 loci. (A) – Gráfico das análises de pares de indivíduos por classe de distância espacial; (B) – Distograma (--) distância genética média observada entre todos os pares de indivíduos da população; (--) distância genética média observada para todos os pares de indivíduos compreendidos em uma determinada classe de distância espacial; (- - e - -) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%).

## 5 Discussão

A distribuição da diversidade genética em populações vegetais é determinada pela sua biologia reprodutiva, que por sua vez, influencia os padrões de cruzamento e dispersão de genes (Hamrick, 1989; Outborg e col., 1999), e pela história evolutiva da população. Hamrick e col. (1992) ressaltam o importante papel que a distribuição geográfica e a história evolutiva das espécies desempenham na distribuição da variação genética entre e dentro das populações. Neste trabalho, a técnica de AFLP foi empregada na detecção e caracterização da variação genética inter e intrapopulacional de *C. brasiliense*, sendo que quatro populações amostradas no Brasil e uma população na Costa Rica. Os resultados obtidos possibilitaram verificar o nível de polimorfismo presente nas populações. Apesar da natureza dominante dos marcadores AFLP, o número grande de *loci* analisados foi eficiente para a determinação de uma estrutura genética populacional. Marcadores neutros têm sido amplamente empregados para monitorar o nível de polimorfismo em espécies neotropicais e ajudar a desenvolver estratégias de conservação de espécies animais (Knapen e col., 2003) e vegetais, como por exemplo, *Symphonia globulifera* (Aldrich e col., 1998), *Swietenia macrophylla* (Lemes e col., 2003), *Eugenia uniflora* (Margis e col., 2002), *Euterpe edulis* (Gaiotto e col., 2003; Cardoso e col., 2000) dentre outras.

A porcentagem de *loci* polimórficos variou de 55,9 a 91,1 % para todas as populações analisadas (tabela 2) e é superior a estimativa de 50 % de *loci* polimórficos para espécies vegetais encontrada por Hamrick e Godt (1990) podendo-se concluir que a espécie apresenta alto polimorfismo de *loci*.

No trabalho de Nybom (2004) uma metanálise foi feita com o objetivo de avaliar a diversidade intra e interpopulacional em angiospermas e gimnospermas utilizando marcadores AFLP, RAPD e ISSR. Para as análises de AFLP, foi obtido um valor próximo a 0,23 para a estimativa de diferenciação genética ( $F_{st}$ ), e valores de heterozigosidade esperada de 0,26 para espécies com ampla distribuição, que realizam fecundação cruzada, dispersão de sementes mediada por vento e/ou água, e por animais.

Os valores de heterozigosidade ( $H_e$ ) obtidos segundo as expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg variaram de 0,19 para a população de Oriximiná (PA) a 0,32 para Guápiles, Costa Rica. O valor de heterozigosidade total foi de 0,27 (tabela 2). Um padrão parecido de diferenciação genética foi observado para outras espécies tropicais, cujos trabalhos utilizaram marcadores AFLP. De acordo com trabalhos de Hamrick e Godt (1989, 1996) e Nybom e Bartish (2000), que visaram observar níveis de diversidade genética, a *C. brasiliense* satisfaz o critério encontrado para espécies que apresentam altos níveis de diversidade dentro das populações, realizam fecundação cruzada e com ampla distribuição geográfica. De fato, quando todas as populações foram analisadas em conjunto, a diversidade total ( $H_t = 0,27$ ) foi similar ou até maior do que o encontrado para outras espécies tropicais, que também utilizaram marcador AFLP (*Calycophyllum spruceanum*  $H_t = 0,30$ , Russel e col., 1999; *Switenia macrophylla*  $H_t = 0,14$ , Lowe e col., 2003; *Cedrela odorata*  $H_t = 0,27$ , Cavers e col., 2003; *Eugenia uniflora*  $H_t = 0,34$ , Margis e col., 2002), e foi semelhante aos resultados encontrados em Gillies e col. (1997) utilizando marcadores RAPD em populações da Costa Rica de *Cedrela odorata* ( $H_t = 0,34$ ).

O nível de diversidade genética detectado pela análise com AFLP foi relativamente alto para cada população (tabela 2). Valores altos também foram encontrados em outros trabalhos como em Margis e col. (2002) para cada população de *E. uniflora* ( $H_s = 0,30$ ) e, com *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), um valor ainda maior ( $H_e = 0,718 - 0,854$ ) usando marcadores microssatélites (Aldrich e col., 1998). Em Kawaguici e Kageyama (2001) os valores de heterozigosidade obtidos para *C. brasiliense* em três grupos de indivíduos (plântulas, jovens e adultos) usando marcadores isoenzimáticos foi de 0,20. Segundo os autores, esses valores foram considerados superiores às médias encontradas em espécies arbóreas de ampla distribuição. Como esperado para marcadores AFLP, que são altamente polimórficos, a diversidade genética encontrada no presente estudo ( $H_t = 0,27$ ) é maior do que o encontrado em Kawaguici e Kageyama (2001), devido à natureza do marcador (no caso, as isoenzimas são menos polimórficas que o AFLP).

O padrão encontrado de distribuição da variabilidade genética nas populações de *C. brasiliense* indica que a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações (65,3 %) (tabela 4). No entanto, uma quantidade significativa também foi atribuída à variação entre as populações (34,7%). Segundo Loveless e Hamrick (1984), espécies como *C. brasiliense* que apresentam mecanismos eficientes de dispersão de sementes e pólen conduzem a uma maior variação genética dentro das populações do que entre elas, corroborando os dados obtidos no presente estudo. Este padrão é encontrado para a maioria das espécies de plantas tropicais estudadas até o momento (Aldrich e col., 1998; Margis e col., 2002; White e col., 1999; Gillies e col., 1999; Cardoso e col., 2000; Lowe e col., 2000). Gillies e col. (1997) encontraram um resultado semelhante à *C. brasiliense*. Usando marcadores RAPD, observaram que a

maior parte da diversidade está presente dentro das populações de *Cedrela odorata* amplamente distribuídas na Costa Rica (65,1%,  $P < 0,004$ ) e, 35,34%,  $P < 0,004$ , foi atribuída à variação entre as populações. Este fenômeno também foi observado em outros trabalhos (Schierenbeck e col., 1997) e, pode ser o resultado da existência de fluxo gênico entre populações separadas. No entanto, este não deve ser o caso da *C. brasiliense*, já que não existe contato atual entre as populações.

A análise dos dados revelou um valor de  $F_{st}$  de  $0,26 \pm 0,008$ , mostrando um valor próximo ao obtido no trabalho de Nybom, 2004 ( $F_{st} = 0,23$ ). Este dado indica que, *C. brasiliense*, assim como outras espécies tropicais, apresenta altos níveis de diversidade intrapopulacional, com uma menor variação entre as populações. O valor de  $F_{st}$  reflete a ausência de fluxo gênico nos dias atuais, principalmente devido à amplitude geográfica em que as populações foram amostradas. Russel e col. (1999), utilizando marcadores AFLP, observaram valores de  $F_{st}$  de 0,118 para a espécie *Calycophyllum spruceanum*. Essa espécie é típica de locais alagados na Bacia Amazônica e apresenta fecundação cruzada, polinização mediada por insetos e dispersão de sementes pelo vento e água. Já em Cardoso e col. (2000) foi encontrado um valor de  $F_{st} = 0,42$ , indicando alto nível de diferenciação genética entre as populações de *Euterpe edulis* numa área de 40 -1700 Km.

Os dados sugerem que a geografia pode desempenhar um papel tão importante quanto o histórico de vida no estabelecimento da estrutura populacional da *C. brasiliense*. Comparações par a par (tabela 3) indicaram níveis menores de diferenciação genética entre Oriximiná (PA) e Tiradentes (MG), as quais estão separadas por aproximadamente 2000 Km. É possível que essas duas populações tenham mantido um fluxo gênico mais intenso durante os períodos de retração e

expansão das florestas tropicais. Já entre as outras populações, e entre Tiradentes e Macaé, Tiradentes e Guápiles, Oriximiná e Macaé, e Oriximiná e Guápiles, o  $F_{st}$  variou de 0,24 a 0,28, não diferindo muito entre as mesmas, apesar do esperado ser quanto mais distante espacialmente, maior a diferenciação genética. Em contraste, Tiradentes mostrou um valor maior de diferenciação genética com Macaé (RJ), que está mais próxima geograficamente (300 Km). E, os valores entre Tiradentes e Guápiles, Macaé e Guápiles e Macaé e Oriximiná, as quais estão separadas por 2000 a 5000 Km, aproximadamente, não diferiram muito do obtido entre Tiradentes e Macaé.

Para as análises da presente dissertação é importante levar em consideração a distância entre as populações analisadas. Três trabalhos utilizando microssatélites em espécies Neotropicais abrangeram uma amplitude geográfica semelhante a este estudo, os quais encontraram divisões entre as populações. O trabalho de Lemes *et al.* (2003) analisou sete populações de *Swietenia macrophylla* distribuídas por 2100 Km na Amazônia brasileira. Foi encontrada variabilidade genética significativa entre as populações e uma moderada variação genética entre elas. Os dados sugeriram que a continuidade da floresta Amazônica, onde aparentemente as barreiras geográficas ao fluxo gênico são mínimas e pela estabilidade climática na América do Sul durante o Pleistoceno, podem ter contribuído para a manutenção da diversidade. Um trabalho complementar ao de Lemes conduzido por Novick *et al.* (2003) com populações de *Swietenia macrophylla* na América Central, os resultados obtidos foram parecidos. E às diferenças encontradas entre as populações, foi atribuída a geografia do local como uma barreira genética separando as populações do lado Pacífico e do lado Atlântico. Collevatti *et al.* (2001) encontraram valores moderados de diversidade populacional na espécie *Caryocar brasiliense* ao longo de uma abrangência geográfica semelhante aos



estudos discutidos acima, na região do Cerrado. Em todos esses trabalhos foi encontrado um padrão de isolamento por distância entre as populações, consistentes com a ampla escala geográfica em que as populações foram amostradas. O mesmo resultado foi encontrado para *Euterpe edulis* na Mata Atlântica (Cardoso e col., 2000).

A diferenciação genética encontrada entre as populações de *C. brasiliense* provavelmente reflete uma influência de fatores ecológicos, evolutivos e biogeográficos, tais como, mecanismos de dispersão de pólen e sementes, história demográfica e barreiras geográficas ao fluxo gênico (Alvarez-Buylla e col., 1996; Lemes e col., 2003). Considerando a amplitude geográfica do presente estudo e os dados obtidos, os níveis de diferenciação genética entre as populações foi menor do que o esperado.

Atualmente não existe continuidade entre as quatro populações analisadas. A existência de padrões de distribuição disjunto em várias espécies de plantas da floresta Amazônica e Atlântica sugere a possibilidade de conexão entre as floras destas florestas, no passado, através do bioma atualmente denominado cerrado (Rizzini, 1963; Prance, 1982). Vários estudos apóiam essa idéia, ressaltando o papel das matas de galeria nessa conexão (Ratter e col., 1973; Mori, e col., 1981). Provavelmente, os padrões de diversidade genética encontrados são o reflexo dos períodos de contração e expansão das florestas tropicais durante as oscilações climáticas do período Quaternário (Bigarella e col., 1975). A dispersão e o intercâmbio de espécies entre biotas são dependentes de configurações geográficas e eventos históricos, os quais são importantes mecanismos reguladores da riqueza de espécies nas comunidades (Scluter e Ricklefs, 1993 a, b). Possivelmente, essas populações devem ter passado por várias gerações parcialmente isoladas como resultado da fragmentação florestal e o ciclo de vida da espécie. Como conseqüência, a diferenciação genética observada

entre as populações de *C. brasiliense* pode ser o resultado do seu ciclo de vida, o sistema de acasalamento e mecanismos de dispersão, associado com o processo de fragmentação das florestas tropicais.

Riveira-Ocasio e col. (2002) sugerem que a amplitude espacial de estudos genéticos seja aumentada para melhor compreensão dos fatores históricos, físicos e biológicos que modelaram a variação intraespecífica incluindo: (i) migração e rotas de colonização; (ii) a identificação de populações-fonte; e (iii) a importância da deriva genética e o fluxo gênico na dinâmica das populações. Sendo assim, são necessárias informações a cerca da variação genética em populações de *C. brasiliense* proveniente de regiões de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo, procurando abranger uma área de ampla distribuição da espécie a fim de compreender o padrão de diversidade genética encontrado no presente estudo. Assim como, obter informações sobre a possível origem do centro dispersor da espécie *C. brasiliense* que contribua na elucidação do seu padrão de colonização histórico.

A estrutura genética espacial em plantas naturais é definida como a distribuição não aleatória da variação genética entre indivíduos (Sato e col., 2006). Esta é determinada pela interação de vários fatores, tais como, fluxo gênico, seleção natural e processo de colonização, e distribuição espacial de indivíduos e das populações (Epperson, 1993; Hamrick e Nason, 1996). A distribuição espacial da variabilidade genética dentro das populações naturais de plantas pode influenciar significativamente os processos evolutivos e ecológicos dessas populações, resultando em agregados de genótipos específicos (Schapcott, 1995). Embora a estrutura genética espacial seja conseqüência, principalmente, de um limitado fluxo de pólen e semente, existe também a influência de fatores localizados, como variação espacial na distribuição da espécie e

variação na seleção de micro-habitats (Epperson e Li, 1997; Vekemans e Hardy, 2004). Portanto, os mecanismos de dispersão de uma determinada espécie podem influenciar diretamente na sua estrutura genética espacial (Hamrick e *col.*, 1993). A determinação dos padrões e níveis de fluxo gênico via pólen e dispersão de sementes são os mais críticos no estabelecimento da estrutura genética (Hamrick e Nason, 1996). Segundo Degen e *col.* (2001) as relações existentes entre dispersão e estrutura genética espacial são: baixa dispersão de sementes, forte estruturação genética; ampla dispersão, baixa estruturação genética.

Espécies típicas de florestas tropicais tendem a exibir um padrão espacial de distribuição agregado (Condit e *col.*, 2000) e a distribuição espacial limitada das sementes contribui para esse padrão. Modelos teóricos predizem a existência de estruturação genética espacial quando o fluxo gênico é restrito (Wright, 1978), e ausência de estruturação espacial quando o fluxo via sementes é extenso. Segundo Bawa (1990), é difícil prever padrões de fluxo gênico em espécies tropicais devido ao comportamento imprevisível do agente dispersor.

Os estudos sobre a estrutura espacial de populações são importantes, pois a estruturação afeta a estimativa de muitos parâmetros genéticos populacionais como, por exemplo, a taxa de cruzamento (Epperson, 1989). O conhecimento sobre a estrutura espacial populacional é importante quando populações de plantas são selecionadas para a conservação (Shapcott, 1995). Ainda, o estudo da variabilidade genética pode levar a novas introspecções sobre as causas que determinam a partilha observada entre a variação entre e dentro das populações (Leonardi e Menozzi, 1996). Visando esses objetivos, diversos estudos recentes têm tentado compreender a ligação entre um fluxo limitado de pólen e sementes e os padrões de variação genética

encontrados em espécies tropicais (Degen e *col.*, 2004; Sezen e *col.*, 2005). Nesse sentido, numa segunda etapa do trabalho, a estrutura genética espacial intrapopulacional de *C. brasiliense* foi analisada correlacionando-se a distância genética e distância euclidiana (em metros) entre os indivíduos.

Para a população pertencente à Guápiles (Costa Rica), observou-se na figura 11B que não há estruturação entre os indivíduos desta população, indicando que não há preferência de cruzamento entre indivíduos mais próximos. Ou seja, a população se comporta como uma população panmítica em que todos os indivíduos se reproduzem ao acaso. Já no resultado obtido para a população pertencente ao Parque Nacional Restinga de Jurubatiba (Macaé - RJ), foi visto que a distância genética observada entre pares de indivíduos que distam até, aproximadamente, 75 m entre si é menor do que a esperada para uma população panmítica (Figura 12B). O mesmo resultado foi encontrado na análise da subpopulação composta pelo maior número de indivíduos (Macaé 1). Observou-se também menor distância genética entre pares de indivíduos distantes até 75 metros, aproximadamente (figura 14).

Apesar da dispersão da *C. brasiliense* poder ser mediada pela água e por morcegos, principalmente, pode ser que exista uma preferência de cruzamento entre os indivíduos mais próximos, no caso de Macaé. Alguns estudos demonstraram que o fluxo gênico restrito via pólen e/ou sementes, padrões de distribuição e seleção microambiental podem influenciar a estrutura genética de populações vegetais (Sokal e Wartenberg, 1983; Epperson, 1990; Doligez e *col.*, 1998). Futuyma (1992) comenta que como em uma população existem limitações físicas que não permitem o cruzamento de todos com todos, ou seja, cruzamentos aleatórios, deve haver maior probabilidade de cruzamento entre indivíduos mais próximos, estruturando a população. Adicionalmente,

o arranjo espacial dos genótipos em estruturação de famílias pode ser causado por alguns fatores ecológicos como a restrita dispersão de pólen e sementes. O fluxo gênico via dispersão de sementes, contrariamente a sua natureza homogeneizadora, podem operar como uma fonte importante de heterogeneidade local em curtas distâncias (Barrett e Kohn, 1991). Usando marcadores de DNA RAPD, Degen e col. (2001) estudaram a estrutura genética espacial de oito espécies tropicais em Paracou, na Guiana Francesa. Eles observaram que para a espécie *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), que apresenta características semelhantes à *C. brasiliense*, tais como dispersão de sementes mediada por morcegos e encontrada exclusivamente em locais alagados (Scarano e col. 1997), não foi encontrada nenhuma estruturação genética espacial, ou seja, os indivíduos da população se comportam como uma população panmítica. Este resultado foi interpretado como sendo a causa de ampla dispersão das sementes mediadas por morcegos. Para a *C. brasiliense*, dois resultados diferentes foram encontrados. De forma semelhante ao trabalho com *S. globulifera*, o mesmo resultado foi encontrado para a população de Guápiles, mas não para a de Macaé (RJ). Nesta última, observou-se uma tendência moderada de árvores mais próximas apresentarem genótipos parecidos do que as árvores que se encontram mais distantes.

Para a população de Guápiles foram encontrados resultados mais consistentes com o padrão de dispersão das sementes mediada por animais e/ou água, como descrito para a espécie, possibilitando o alcance a longas distâncias e o extensivo fluxo gênico entre os indivíduos. Baseando-se ainda na assertiva acima, pode-se supor que os altos índices pluviométricos (4000 mm anuais) encontrados nesta região possam favorecer a dispersão dos frutos a longas distâncias através da água, já que espécie cresce ao longo de córregos e rios, e que podem mediar a dispersão e o

estabelecimento das sementes distantes da árvore parental. No entanto, com relação à dispersão de sementes mediada por morcegos, não foi encontrado nenhum registro na literatura que demonstre o comportamento desses animais na Costa Rica.

Em Macaé, a dispersão de sementes mostra-se mais restrita. Isto pode ser devido à influência de dois fatores: O primeiro é relativo ao comportamento do agente dispersor, pois foi visto por Mello e *col.* (2005) que, apesar de alguns frutos terem sido dispersos a longas distâncias, outros foram encontrados embaixo ou próximos à árvore parental. O trabalho foi feito com morcegos do gênero *Artibeus* em uma área de restinga no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, estado de São Paulo. O segundo pode estar relacionado ao tipo de inundação característico de restinga, o qual ocorre pelo lençol freático. Marques (1994) retratou que em águas estagnadas, as sementes não são dispersas a longas distâncias, ficando assim, restrita a indivíduos mais próximos.

Outro fator a ser considerado é a densidade de indivíduos de cada população amostrada. Nota-se que em Macaé, os indivíduos estão muito mais próximos uns dos outros apresentando alta densidade (2,5 ind./hectare), enquanto que os indivíduos em Guápiles estão mais espaçados e apresentam densidade bem menor (0,30 ind./hectare).

A diferenciação encontrada entre as regiões abordadas neste trabalho parece estar relacionada aos eventos naturais e à história evolutiva da espécie. Em geral, programas de conservação e manejo de populações ressaltam a importância de se conhecer as variações de diversidade genética, do fluxo gênico e das taxas de fecundação em populações nas quais há grande influência de fatores ecológicos e, principalmente antrópicos (Muona, 1990). Portanto, nesses casos deve-se levar em

conta essa diferenciação. Para que a maior parte da variabilidade genética apresentada pela espécie *C. brasiliense* seja preservada, cada uma das populações abordadas neste estudo deve ser conservada.

Além do mais, a perda de diversidade genética tem implicações quanto à persistência de espécies e populações. Com baixos níveis de variação genética elas se tornam vulneráveis a extinção devido à fatores estocásticos e à redução da adaptação (*fitness*), que diminui a capacidade das espécies em responder adaptativamente às mudanças ambientais futuras (Falconer, 1996; Frankham, 1996).

## 6 Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho, os níveis da organização espacial e a dinâmica da diversidade genética de quatro populações de *C. brasiliense* provenientes de Macaé (RJ), Oriximiná (PA), Tiradentes (MG) e Guápiles (Costa Rica) foram avaliados através de marcadores nucleares AFLP. Os resultados deste trabalho podem ser úteis para a conservação e o manejo consciente da espécie, principalmente por que *C. brasiliense* vem sendo considerada como uma espécie com potencial para utilização no reflorestamento comercial, oferecendo subprodutos importantes tanto para a construção de móveis como para a obtenção de compostos farmacológicos.

A análise da distribuição da diversidade genética mostrou que as populações apresentaram a maior parte da diversidade dentro delas. Verificou-se também alta estruturação entre Macaé e Tiradentes em comparação com cada uma dessas duas populações com as outras, que apresentaram estruturação mais leve.

A estrutura genética espacial intrapopulacional variou entre as áreas de estudo. No caso de Macaé, parece haver um fluxo gênico mais intenso entre indivíduos espacialmente mais próximos (< 50 m). Já em Guápiles, não foi observada nenhuma estruturação, refletindo o comportamento de uma população panmítica.

Para melhor compreender a dinâmica e os processos envolvidos na manutenção da diversidade genética de *C. brasiliense*, as seguintes estratégias poderão ser aplicadas:

- Analisar um número maior de populações, buscando englobar toda a área de distribuição *C. brasiliense* para compreender os padrões de distribuição e diversidade encontrados e o histórico de colonização desta espécie;



- Aplicar testes de paternidade com o intuito de melhor compreender a biologia reprodutiva e o fluxo gênico da espécie;
- Estabelecer estratégias de manejo, já que a *C. brasiliense* é muito utilizada para construções em geral visando a conservação da espécie para que futuras gerações possam usufruir de forma consciente dos produtos oferecidos pela espécie.

## 7 Referência Bibliográfica

Ab'Saber, A.N. 1979. Os mecanismos de desintegração das paisagens tropicais no Pleistoceno. Efeitos paleoclimáticos do período Würm-Wisconsin no Brasil, Inter-Facies escritos e documentos 4: 1-11.

\_\_\_\_\_. 1980. Razões da retomada parcial da semi-aridez holocênica, por ocasião do otimum climaticum, primeiras idéias. Inter-Facies escritos e documentos, 8: 1-7.

Aldrich, P.R.; Hamrick, J.L.; Chavarriaga, P.; Kochert, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, 7: 933-944.

Alvarez-Buylla, E.R. e Garay, A.A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution*, 48: 436-453.

Alvarez-Buylla, E.R.; García-Barros, R.; Moreno-Lara, C.; Martinez-Ramos, M. 1996. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 387-421.

Andrade-Lima, D. 1964. Contribuição à dinâmica da flora do Brasil. *Arq. Inst. Ci. Terra*. 2: 15-20.

Andrade-Lima, D. 1966. Contribuição ao estudo do paralelismo da flora Amzônica-Nordestina. *Boletim técnico 19, Nova série do Instituto de Pesquisa Agronômica, Recife*.

Anthony, F., Bertrand, B., Quiros, O., Wilches, A., Lashermes, P., Berthaud, J. e Charrier, A. 2001. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.

Barret, S. C. H. e J. R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. *In* D. A. Falk and K. E. Holsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, 3-30. Oxford University Press, New York, NY.

Barrat-Segretain, M.H. 1996. Strategies of reproduction, dispersion, and competition in river plants: a review. *Vegetatio* 123: 13-37.

Bawa, K.S.; Perry, D.R.; Beach, J.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rainforest trees. 1. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *Am J Bot* 72: 331–345.

Bawa, K.S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annu. Rev. Ecol. Systematics*, 21: 399-422.

Bawa, K.S. e Dayanandan, S. 1998. Tropical deforestation: Causes and institutional constraints to conservation. In: B. Goldsmith (ed.) *Tropical Rainforest: A wider perspective*. Chapman and Hall, England.

Bigarella, J.J., De Andrade-Lima, D., e Riehs, P.J. 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, 47, 411-464.

Boshier, D.H.; Chase, M.R.; Bawa, K.S. 1995a. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. *Am J Bot* 82: 476–483.

\_\_\_\_\_ 1995 b. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood, and population substructure. *American Journal of Botany*, 82, 484–490.

Bouzat, J.L. 2001. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. *Biological Conservation*, 99: 277-284.

Cabrera, A.L. e Willink, A. 1973. *Biogeografía de América Latina*. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.

Cain, M. L., B. G. Milligan and A. E. Strand. 2000. Long-distance seed dispersal in plant populations. *American Journal of Botany* 87:1217–1227.

Cardoso, M.A.; Provan, J.; Powell, W.; Ferreira, P.C.G. e de Oliverira, D.E. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Molecular Ecology* 7: 601–608.

Cardoso, S.R.S.; Eloy, N.B.; Provan J.; Cardoso, M.A. e Ferreira, P.C.G. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9: 1753–1760.

Carlquist, S. 1965. *Island life*. Natural History Press, Garden City, New York, New York, USA.

Carlquist, S. 1967. The biota of long-distance dispersal. V. Plant dispersal to Pacific islands. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 94: 129–162.

\_\_\_\_\_. 1965. *Island life*. Natural History Press, Garden City, New York, New York, USA.

Cavallari-Neto, M. 2004. Efeito do manejo da diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lam (DC) por marcadores isoenzimáticos. Dissertação de Mestrado.

Cavers, S.; Navarro, C. e Lowe, A. J. 2003. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics*, 4: 571-580.

Cavers, S.; Degen, B.; Caron, H.; Lemes, M.R. ; Margis, R. ; Salgueiro, F. e Lowe, A.J. 2005. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity*, 95: 281-289.

Chalmers, K.J.; Waugh, R.; Sprent, J.I.; Simons, A.J.; Powell, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *Gliricidia maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 69, 465–472.

Chambers, J.C. and J.A. MacMahon. 1994. A day in the life of a seed: movements and fates of seeds and their implications for natural and managed systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5: 263-292.

Chase, M.R.; Boshier, D.H.; Bawa, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. *American Journal of Botany*, 82: 468–475.

Chilpa, R. R.; Muñiz, E. E.; Apan, T. R.; Amekraz, B.; Aumelas, A.; Jankowski, K.; Torrez, M. V. 2004. *Life Sci.*, 75, p. 1635.

Coles, J.F & Fowler, D.P. 1976. Inbreeding in neighboring trees in two White Spruce populations.. *Silvae Genetica*, v. 25, n. 1, p. 29-34.

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

Condit, R., Ashton, P.S., Baker, P., Bunyavejchewin, S.S., Gunatilleke, S., Gunatilleke, N., Hubbell, S.P. 2000. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. *Science*, 288: 1414-1418.

Correa, M. P. 1984. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, vol. III, p. 388.

Crawford, R.M.M. 1977. Tolerance of anoxia and ethanol metabolism in germinating seeds. *New Phytologist*, 79: 511-517.

Da Silva, K. L.; Dos Santos, A. R.; Mattos, P. E.; Yunes, R. A.; Delle- Manache, F.; Cechiinel-Filho, V. 2001. *Therapie*, 56, 431.

Dayanandan, S.; Dole, J.; Bawa, K. e Kesseli, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, 8: 1585-1592.

Degen, B. ; Caron, H. ; Bandou, E. ; Maggia, L. ; Chevallier, M.H. Leveau, A. e col. (2001a). Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity*, 87: 497-507.

Degen, B., Petit, R.J., & Kremer, A. 2001b. SGS – Spatial Genetic Software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. *Journal of Heredity*, 92 (5): 447-449.

Degen, B.; Bandou, E. e Caron, H. 2004. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity*, 93 (6): 585-591.

Doligez, A. e Joly, H.I. 1997. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French guiana. *Heredity*, 79: 72-82.

Doligez, A.; Baril, C.; Joly, H.I. 1998. Fine-scale spatial genetic structure with non-uniform distribution of individuals. *Genetics*, 148: 905–919.

Epperson, B.K. e Allard, R.W. 1989. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of *Lodgepole Pine*. *Genetics*, 121:369-377.

Epperson, B.K. 1993. Spatial and space-time correlations in systems of subpopulations with genetic drift and migration. *Genetics*, 133: 711–727.

Epperson, B.K. 1995. Spatial distributions of genotypes under isolation by distance. *Genetics*, 140:1431-1440.

Epperson, B.K. e Li, T.Q. 1996. Measurement of genetic structure within populations using Moran's spatial autocorrelation statistics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 10528–10532.

\_\_\_\_\_ 1997. Gene dispersal and spatial genetic structure. *Evolution*, 51(3), 672-681.

Epperson, B.K. 2004. Multilocus estimation of genetic structure within populations. *Theoret Popul Biol*, 65: 227–237.

Estrada, A. e Fleming, T.H. 1986. *Frugivores and seed dispersal*. The Hague. W. Junk, 346 p.

Excoffier, L.; Smouse, P.E. 1992. Quattro, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial – DNA restriction data *Genetics*, v. 131, p. 479-491.

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* (submitted).

Falconer, D.S. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Longman: Harlow.

FAO. 2001. *Forest Resources Assessment 2000: Main Report*. Rome. (FAO Forestry Paper, 140).

Felfili, J. M.; Filgueiras, T. S.; Haridasan, M.; Silva Júnior, M. C.; Mendonça, R.; Rezende, A.V. 1994. Projeto biogeografia do bioma cerrado: vegetação e solos. *Cadernos de Geociências do IBGE, Rio de Janeiro*, v. 12, p. 75-166.

Felfili, J. M.; Mendonça, R.; Walter, B. M. T.; Silva Júnior, M. C.; Nóbrega, M. G. G.; Fagg, C. W.; Sevilha, A. C.; Silva, M. A. 2001a. Flora fanerogâmica das matas de galeria e ciliares do Brasil Central. In: Ribeiro, J. F.; Fonseca, C. E. L.; Souza-Silva, J. C. *Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria*. Planaltina, DF: [s.n.], v. 1, p. 195-209.

Ferraz, J. B. 1993. Soil factors influencing the reforestation on mining sites in amazonia, Lieth, H.; Lohmann, M. (Eds.), *Restoration of Tropical Forest Ecosystems*, v. 47, p. 52.

Figliolia, M.B. & Kageyama, P.Y. 1995. Dispersão de sementes de *Inga uruguensis* Hook. Et Arn. em floresta ripária do rio Mogi Guaçu, município de Mogi Guaçu – SP. *Rev. Inst. Florestal* 7: 65-80.

Fisher, M.; Husi, R.; Prati, D. 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, v. 87, p. 1128-1137.

Fischer, E. e Santos, F.A.M. 2001. Demography, phenology and sex of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) trees in the Atlantic Forest. *Journal of Tropical Ecology*, 17: 903-909.

Fleishman, E.; Launer, A.E.; Switky, K.R.; et al. 2001. Rules and expectations in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylantus palmatus* and its implications for management planning. *Biological Conservation*, v. 98, p.45-53.

Fleming, T.H. 1981. Fecundity, fruiting pattern, and seed dispersal in *Piper amalago* (Piperaceae), a bat-dispersal tropical shrub. *Oecologia*, 51: 42-46.

Flores, E. M. *Calophyllum brasiliense* Cambess. Academia Nacional de Ciências da Costa Rica, Costa Rica.

Frankham, R. 1996. Relationships of genetics variation to population size in Wildlife. *Conservation Biology*, v.10, p. 1500-1508.

Futuyma, D.G. 1992. *Biologia Evolutiva*. 2. Ed. Ribeirão Preto. SBG/CNPq, 646 p.

Gaiotto, F.A.; Grattapaglia, D. e Venkovsky, R. 2003. Genetic structure, mating system and long distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of heredity*, 94 (5): 399-406.

Galetti, M. & Pedroni, F. 1994. Seasonal diet of capuchin monkeys (*Cebus apella*) in a semideciduous Forest in south-east Brazil. *J. Trop. Ecol.*, 10: 27-39.

Gillies, A. C. M.; Cornelius, J. P.; Newton, A. C.; Navarro, C.; Hernández, M.; Wilson, J. 1997. *Molecular Ecology*, 6: 1133-1145.

Gillies, A.C.M.; Navarro, C.; Lowe, A.J.; Newton, A.C.; Hernandez, M.; Wilson, J. e Cornelius, J.P. 1999. Genetic diversity in mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assed using RAPDs. *Heredity*, 83: 711–732

Griffith, A.B.; I.N. Forseth. 2003. Establishment and reproduction of *Aeschynomene virginica* (L.) (Fabaceae) a rare, annual, wetland species in relation to vegetation removal and water level. *Plant Ecology* 167: (in press).

Gusson, E., Sebbenn, M.A., Kageyama, P.H. 2005. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Escheweilera ovata*. *Scientia Forestalis*, n. 67, p. 123-135.

Hall, P.; Chase, M.R.; Bawa, K.S. 1994. Low genetic variation but high population differentiation in a common tropical forest tree species. *Conservation biology*, 8:471-482.



Hamrick, J.L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural populations. In.: Schone-Wald-Cox, C.M; Chambers, S.H; Macbyde, B; Thomas N, L. Genetics and Conservation. Menlo Park: Benjamin Cummings,. p. 335-348.

\_\_\_\_\_.1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: *Isozymes in Plant Biology* (eds Soltis DE, Soltis PS), pp. 87–105. Dioscorides Press, Portland, OR.

Hamrick, J.L. 1990. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In *Isozymes in Plant Biology*. Eds.: Soltis, E.D., Soltis P.S.), p. 87-105. Chapman and Hall, London.

Hamrik, J.L., Loveless, M.D. 1986. Isoenzyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. *Biotropica*, 18:201-207.

Hamrik, J.L., Loveless, M.D. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with the reproductive biology. In: Bock, J.E., Linhart, Y.B. (ed.) *Evolutionary ecology of plants westview*. Colo: Press Boulder, p. 129-146.

Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, Breeding and genetic resources* (eds. Brown, A.H.D, Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S.), pp. 43-63. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

\_\_\_\_\_. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L; Weir, B.S. (Ed.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland: Sinauer, p. 43-63.

\_\_\_\_\_. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, 351: 1291-1298.

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

Hamrick, J.L., Murawski, D.A. e Nason, J.D. 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetation*, 108, 281-297.

- Hamrick, J.L. e Loveless, M.D. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In Estrada, A. and Fleming, T.H. (eds), *Frugivores and seed dispersal*.
- Hubbell, S.P. 1979. Tree dispersion, abundance and diversity in a tropical dry forest. *Science*, 203: 1299-1309.
- Ito, C.; Itoigawa, M.; Mishina, Y.; Cechinel-Filho, V.; Enjo, E.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa. 2003. *J. Nat. Prod.*, 66: 368.
- Kageyama, P.Y; Lepsch-Cunha, N. M. 2001. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. In: Garay, I; Dias, B. F. S. (Ed.). *Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais*, Petrópolis: Editora Vozes, p. 199-214.
- Kangas, P. 1994. Riparian influences on a tropical river ecosystem in Belize, Central America. *Int. J. Ecol. Environ. Sci.*, 20: 109-118.
- Kawaguici, C. B; Kageyama, P. Y. 2001. Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. *Scientia Forestalis*, n. 59, p. 131-143.
- Kellman, M., Tackaberry, R. and Meave, J. 1996. The consequences of prolonged fragmentation: lessons from tropical gallery forests. In: Schelhas, J. and Greenberg, R. (eds), *Forest patches in tropical landscapes*. Island Press, pp. 37-58.
- Klinge, H., Junk, W. J. e Revilla, C. J. 1990. Status and distribution of forested wetlands in tropical South America. *Forest Ecology and Management*, 33/34: 81–101.
- Koslowski, T.T. 1984. Responses to woody plants to flooding. In: *Flooding and plant growth* (T.T. Koslowski, ed.) Academic Press, London, p.129-163.
- Johansson, M.E.; C. Nilsson. 1993. Hydrocory, populations dynamics and distribution of the clonal aquatic plant *Ranunculus lingua*. *Journal of Ecology*, 81: 81-91.

Joly, C. A. 1991. Flooding tolerance in tropical forest trees. Pp. 23–34 in Jackson, M. B., Davies, D. D. & Lambers, H. (eds). Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry. SBP Academic Publishing, The Hague.

Jones, B.; Gliddon, C.; Good, J.E.G.; 2001. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Loydia serotina* (Liliaceae) in Britain. Biological Conservation, v. 101, p. 147-156.

Junk, W.J., Bayley, P.B., Sparks, R.E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 106: 110-127.

Knapen, D., Knaepkens, G., Bervoets, L., Taylor, M.I., Eens, M., Verheyen, E. 2003. Conservation units based on mitochondrial and nuclear DNA variation among European bullhead populations (*Cottus gobio* L.) from Flanders. Belgium Conserv. Genet., 4, 129-140.

Lapa, R. P. A bauxita e o rejeito da bauxita. In: Bozelli, R. L.; Esteves, F.A.; Roland, F. (Eds). Lago Batata: impacto e recuperação de um ecossistema amazônico. Rio de Janeiro: IB-UFRJ/SBL, 2000. 27-35p.

Larmer, Brook; SEN, Alexandra A. 2003. China, um Insaciável Apetite por Madeira. São Paulo: Jornal O Estadão.

Ledru, M.P. 1991. Etude de la pluie pollinique actuelle dès fôrets du Brèsil central : climat, végétation, application à l'étude de l'évolution pléoclimatique des 30.000 dernière années. Unpublished doctorate thesis, Museum National d'Historie Naturelle, Paris.

Ledru, M.P. 1993. Late Quaternary environmental and climatic changes in central Brazil. Quatern. Res., 39: 90-98.

Lemes, M. R.; Gribel, R.; Proctor, J.; Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla*, King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation of microsatellite loci: implications for conservation. Molecular Ecology, 12, 2875-2883.

Leonardi, S. & Menozzi, P. 1996. Spatial structure of genetic variability in natural stands of *Fagus sylvatica* L.(beech) in Italy. Heredity, 77:359-368.

Levin, D.A. e Kerster, H.W. 1974. Gene flow in seed plants. *Evol Biol.*, 7: 139–220.

Lobo, P.C. & Joly, C.A. 1998. Tolerance to hypoxia and anoxia in Neotropical tree species. *Oecologia Brasiliensis*, 4: 137-156.

Lorenzi, H. 1992. *Árvores brasileiras*. Nova Odessa: Plantarum, 116p.

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

Loveless, M.D. 1992. Isoenzyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New forests*, 6: 67-94.

\_\_\_\_\_. 1998. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic Neotropical tree. *Heredity*, 81: 134-143.

Loveless, M.D.; Hamrick, J.L.; Foster, R.B. 1998. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity*, 81: 134-143.

Lowe, A.J.; Gillies, A.C.M.; Wilson, J. e Dawson, I.K. 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, 9: 831–841

Lowrance, R. R. et al. 1984. Riparian forests as nutrient filters in agricultural watersheds. *BioScience*, 34: 374-377.

Malanson, G. P. 1993. *Riparian landscapes*. Cambridge University Press, Cambridge. 296 pp.

Maltby, E. 1991. Wetlands – their status and role in the biosphere. Pp. 3–21 in Jackson, M. B., Davies, D. D. & Lambers, H. (eds). *Plant life under oxygen deprivation*. SBP Academic Publishing, The Hague.

Margis, R.; Felix, D.; Caldas, J.F.; Salgueiro, F.; De Araujo, D.S.D.; Breyne, P.; Van Montagu, M.; De Oliveira, D.; Margis-Pinheiro, M. 2002. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. *Biodiversity and conservation*, 11: 149-163.

Marimon, B.S.; Felfili, J.M. & Lima, E.S. 2002. Floristics and Phytosociology of the Gallery forest of the Bacaba stream, Nova Xantina, Mato Grosso, Brazil. *Edinburgh Journal of Botany*, 59 (2): 303–318.

Marques, M.C.M. 1994. Estudos auto-ecológicos do guanandi (*Calophyllum brasiliense* Camb. Clusiaceae) em uma mata ciliar do município de Brotas, SP. M.Sc. Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Brazil, 105 pp.

Marques, M.C.M.; Joly, C.A. 2000. Estrutura e dinâmica de uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb. em floresta higrófila do sudeste do Brasil. *Revista bras. Bot.*, São Paulo, v.23, n.1, p.107-112, mar.

Medellin, R. A. and Redford, K. H. 1992. The role of mammals in neotropical forest-savanna boundaries. In: Furley, P. A., Proctor, J. and Ratter, J. A. (eds), *Nature and dynamics of forest-savanna boundaries*. Chapman and Hall, pp. 519-548.

Meio, B.B., Freitas, C.V., Jatobá, L., Silva, M.E.F., Ribeiro, J.F., Henriques, R.P.B. 2003. Influência da flora das florestas Amazônica e Atlântica na vegetação do cerrado *sensu stricto*. *Revista Brasileira de Botânica*, v.26, n.4, p.437-444.

Melo, Lúcia Carvalho Pinto de; SILVA, Cylon Gonçalves da. 2001. *Ciência, Tecnologia e Inovação: desafio para a sociedade brasileira - Livro Verde*, Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, Academia Brasileira de Ciências, 250p.

Mello, M.A.R; Leiner, N.O; Guimarães, P.R; Jordano, P. 2005. Size-based fruit selection of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) by bats of the genus *Artibeus* (Phyllostomidae) in a Restinga área, southeastern Brazil. *Short Notes*.

Mena, M. El clima em Costa Rica. [www.imn.ac.cr](http://www.imn.ac.cr) (9 de Nov. 2004).

Miller, M.P. 1997. *Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA)*.

Mitton, J.B. Conifers. In: Tanksley, S.D.; Orton, T.J. (Ed.). 1983. *Isozymes in plant breeding and genetics*, Amsterdam: Elsevier Science, p. 443-472.

- Moran, G.F. e Hopper, S.D. 1987. Conservation of the genetic resources of rare and widespread eucalypts in remnant vegetation. In: (eds Saunders DA, Arnold GW, Burbidge AA, Hopkins AJM) *Nature Conservation: the Role of Remnants of Native Vegetation*, pp. 151–162. Surrey Beatty & Sons, New South Wales.
- Moran, G.F. 1992. Patterns of genetic diversity in Australian tree species. *New Forests*, 6, 49–66.
- Mori, S.A.; Boom, B.M. e Prance, G.T. 1981. Distribution patterns and observation of eastern Brazilian coastal forest tree species. *Brittonia*, 33: 233-245.
- Morton, J.K; Hogg, E.H. 1989. Biogeography of island floras in the Great Lakes. II. Plant dispersal. *Canadian Journal of Botany*, 67: 1803-1820.
- Muona, O. 1990. Population genetics in forest tree improvement. In: Brown, A.H.D, Clegg, M.T., Khaler, A.L, et al. (Ed.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland, Sinauer, p. 282-298.
- Murawski, D.A. e Hamrick, J.L. 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity* 67: 167–174.
- Nason, J.D. e Hamrick, J.L. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. *J. Heredity*, 88: 264-276.
- Nason, J.D.; Herre, E.A.; Hamrick, J.L. 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature* 391: 685–687.
- Nei, M., 1987 *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Newton, A.C.; Allnut, T.R.; Gillies, A.C.M.; Lowe, A.J. e Ennos, R.A. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 140–145.
- Novick, R.R.; Dick, C.W.; Lemes, M.R.; Navarro, C.; Caccone, A. e Bermingham, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12: 2885-2893.

Nybom, H.; Bartish, I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3/2: 93–114.

Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143-1155.

Okamoto, J.M. 1998. Ecofisiologia da germinação e do metabolismo respiratório de quatro espécies do gênero *Inga Mill* (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Oliveira-Filho, A.T. e Ratter, J.A. 1995. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of the plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany* 52 (2): 141-194.

Ouborg NJ, Piquot Y, Van Groenendael M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*, 87, 551–568.

Palmberg-Lerche, C. 1994. International programmes for the conservation of forest genetic resources. In: R.M. Drysdale, E.E.T. John & A.C. Yap (Eds) *Proc. International Symposium on Genetic Conservation and Production of Tropical Forest Seed*. Chiang Mai, Thailand 14-16 June 1993, organized by the ASEAN/Canada Forest Tree Seed Centre, in collaboration with the Thai Government, FAO, The Forestry and Fuelwood Research and Development Project (F/FRED) and the International Development Research Centre (IDRC). ASEAN-Canada Forest Seed Centre, Muak-Lek, Saraburi (Thailand). pp.78-101.

Pinto, J.R.R. & Oliveira Filho, A.T. 1999. Perfil florístico e estrutura da comunidade arbórea de uma floresta de vale no Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 22:53-67.

Ponnamperuma, F.N. 1984. Effects of flooding on soil. Pp. 10-43. In: T.T. Kozlowski (Ed.), *Flooding and plant growth*. Academic Press, London.

Ponçano, W.L., Carneiro, C.D.R., Bistrichi, C.A., Almeida, F.F.M. & Prandini, F.L. 1981. Mapa geomorfológico do Estado de São Paulo, São Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1. 38-41.

Prado, D.E. & Gibbs, P.E. 1993. Patterns of species distribution in the dry seasonal forests of South America. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 80: 902-927.

Prance, G.T. 1982. Forest refuges: Evidence from woody Angiosperms. In: *Biological diversification in the tropics* (G.T. Prance, ed.), Columbia University Press, New York, p. 137-156.

Prober, S.M.; Tompkins, C.; Moran, G.F.; Bell, J.C. 1990. The conservation genetics of *Eucalyptus paliformis* L. Johnson et Blaxell and *E. parvifolia* Cambage, two rare species from south-eastern Australia. *Australian Journal of Botany*, 36, 447-460.

Ratter, J.A.; Richard, P.W.; Argent, G.T. e Gifford, D.R. 1973. Observations on the vegetation of northeastern Mato Grosso. I. The woody vegetation types of the Xavantina-Cachimbo Expedition area. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 266: 44-492.

Ratter, J. A., Ribeiro, J. F. and Bridgewater, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann. Bot.*, 80: 223-230.

Reitz, R., Klein, R.M. & Reis, A. 1978. Projeto madeira de Santa Catarina. *Sellowia*, 28-30: 218-224.

Revista da Madeira – nº 88 – Ano 15 – Março de 2005.

Ribeiro, Carlos Antonio Álvares; Soares, Vicente Paulo; Oliveira, Ângelo; Marcos Santos e col. The challenge of the delineation of natural preserves. *Rev. Árvore*, Mar./Apr. 2005, vol.29, no.2, p.203-212.

Riveira-Ocasio, E.; Aide, T.M. e McMillan, O. 2002. Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Molecular Ecology*, 11: 675-683.

Rizinni, C.T. 1963. A flora do cerrado. Análise florística das savannas centrais. In *Simpósio sobre o cerrado* (M.G. Ferri, org.). Edusp, São Paulo, p.126-177.



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

Rizzini, C.T., 1979. Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos sociológicos e florísticos. HUCITEC, São Paulo, vol. 2, 374 pp.

Russel, J.R.; Weber, J.C.; Booth, A.; Powell, W.; Sotelo-Montes, C. e Dawson, I.K. 1999. Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology*, 8, 199-204.

Salo, J. S. & Kalliola, R. J. 1991. River dynamics and natural forest regeneration in the Peruvian Amazon. Pp. 245–256 in Gomez-Pompa, A., Whitmore, T. C. & Hadley, M. (eds). *Rain forest regeneration and management*. UNESCO/Parthenon, Paris.

Sato, T., Isagi, Y., Sakio, H., Osumi, K. e Goto, S. 2006. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. *Heredity*, 96, 79-84.

Sauer, J. D. 1988. *Plant migration: the dynamics of geographic patterning in seed plant species*. University of California Press, Berkeley, California, USA.

Sazima, I., Fisher, W. A., Sazima, M. & Fisher, E. A. 1994. The fruit bat *Artibeus lituratus* as a forest and city dweller. *Ciência e Cultura*, 46:164–168.

Scarano, F.R. 1998. A comparison of dispersal, germination and establishment of wood plants subjected to distinct flooding regimes in Brazil flood-prone forests and estuarine vegetation. Pp. 177-194. In: F.R Scarano & A.C. Franco (Eds). *Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the Neotropics*. Series *Oecologia brasiliensis*, vol. IV. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro.

Scarano, F.R., Ribeiro, K.T., Moraes, L.F.D. & Lima, H.C. 1997. Plant establishment on flooded and unflooded patches of a freshwater swamp forest in Southeastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 14: 793-803.

Scarano, F.R. 2002. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. *Annals of Botany*, 90: 517-524.

Schierenbeck, K.A.; Skupski, M.; Lieberman, D.; Lieberman, M. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology*, 6: 137-144.

Schneider, R.L e Sharitz, R.R. 1988. Hydrocory and regeneration in a bald cypress-water tupelo swamp forest. *Ecology*, 69, 1055-1063.

Sebastião Venâncio Martins. 2001. *Recuperação de matas ciliares*. Editora Aprenda Fácil. Viçosa – MG.

Sezen, U.U., Chazdon, R.L. e Holsinger, K.E. 2005. Genetic consequences of second-growth forest regeneration. *Science*, 307(5711), 891.

Shapcott, A. 1995. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). *Heredity*, 74:28-38.

Smith, L.B. 1962. Origins of the flora of southern Brazil. *Contributions from the United States National Herbarium*, 35: 215-249.

Stacy, E.A.; Hamrick, J.L.; Nason, J.D.; Hubbell, S.P.; Foster, R.B.; Condit, R. 1996. Pollen dispersal in low-density populations of three neotropical tree species. *American Naturalist*, 148: 275–298.

Stevenson, P.R. 2001. The relationship between fruit production and primate abundance in neotropical communities.. *Biological Journal of the Linneum Society*, n.72, p. 161-178.

Stiles, E.W. 2000. Animals as seed dispersers. P.111-124. In: M.Fenner (ED.) *Seeds: the Ecology of regeneration in plant communities*, second edition. CABI Publishing, New York, NY, USA.

Sokal, R.R. e Oden, N.L. 1978. Spatial autocorrelation in biology: 1- methodology. *Biological Journal of the Linneum Society*, v.10, p.199-228.

Van der Hammen, T. 1982. Paleoecology of Tropical South America. In: Prance, G.T. (ed.) *Biological diversification in the Tropics*, pp. 60-66. New York: Plenum Press.

Vekemans, X. e Hardy, O.Z. 2004. New insights from fine scale spatial genetic structure analysis in plant populations. *Molecular Ecology*, 13(4), 921-935.

Veneklaas, E. J., Fajardo, A., Obregon, S. and Lozano, J. 2005. Gallery forest types and their environmental correlates in a Colombian savanna landscape. *Ecography*, 28: 236-252.

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van Delee, T., Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP - a new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 23 (21), 4407-4414.

Zucchi, M.I. 2002. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Piracicaba, 130 p. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Ward, M.; Dick, C.W.; Gribel, R. e Lowe, A.J. 2005. To self or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, 95: 246-254.

Wickneswari, R. e Norwati, M. 1993. Genetic diversity of natural populations of *Acacia auriculiformis*. *Australian Journal of Botany*, 41: 65–77.

Wilson, J.; Lowe, A.J.; Cavers, S.; Navarro, C.; Hernandez, M.; Kremer, A. e col. 2001. Assessment of levels and dynamics of intraspecific genetic diversity of tropical trees. Final Scientific Report 1997-2001. European Commission. 76pp.

White, G.M.; Boshier, D.H.; Powell, H. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology*, 8: 1899-1909.

Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, v.28, p. 114-138.

\_\_\_\_\_. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, vol.4. Variability Within and among natural populations. University of Chicago press: Chicago, I.L.

## ANEXO I

Posições geográficas obtidas por GPS. Costa Rica = CR; Macaé =MC.

<b>Indivíduo</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
CR 1	10,204087	-83,881384	CR 15	10,2025	-83,8834
CR 2	10,2053	-83,879344	CR 16	10,2018	-83,8832
CR 3	10,203214	-83,883731	CR 17	10,20223	-83,8811
CR 4	10,203225	-83,883821	CR 18	10,20272	-83,8803
CR 5	10,199452	-83,885893	CR 19	10,20344	-83,8821
CR 6	10,199291	-83,885995	CR 20	10,19908	-83,8861
CR 7	10,199233	-83,885937	CR 21	10,19917	-83,8874
CR 7-1	10,205533	-83,879765	CR 22	10,19798	-83,8865
CR 7-2	10,205409	-83,879809	CR 23	10,19737	-83,8878
CR 755-2	10,205801	-83,879154	CR 24	10,1974	-83,8878
CR 8	10,196107	-83,884383	CR 25	10,1966	-83,8874
CR 8-1	10,204054	-83,880874	CR 26	10,1964	-83,887
CR 9	10,195894	-83,884662	CR 27	10,19516	-83,8863
CR 931-10	10,204097	-83,882344	CR 28	10,19548	-83,8859
CR 932-5	10,203937	-83,882436	CR 29	10,19562	-83,886
CR 10	10,200545	-83,884166	CR 30	10,19253	-83,8845
CR 11	10,200612	-83,884606	CR 31	10,19697	-83,8867
CR 12	10,201055	-83,884284	CR 312-6	10,20203	-83,8839
CR 13	10,200937	-83,884237	CR 324-6	10,20176	-83,8842
CR 14	10,199111	-83,883872	CR 334-9	10,20174	-83,8843
<b>Indivíduo</b>	<b>Lat</b>	<b>Long</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>Lat</b>	<b>Long</b>
MC-01	22°14,440`	41°35,176`	MC-47	22°14,397`	41°35,234`
MC-02	22°14,432`	41°35,168`	MC-48	22°14,400`	41°35,230`
MC-03	22°14,555`	41°35,471`	MC-49	22°14,394`	41°35,230`
MC-04	22°14,550`	41°35,471`	MC-50	22°14,382`	41°35,254`
MC-05	22°14,544`	41°35,464`	MC-51	22°14,371`	41°35,243`
MC-07	22°14,557`	41°35,456`	MC-52	22°14,370`	41°35,242`
MC-08	22°14,531`	41°35,431`	MC-53	22°14,383`	41°35,219`
MC-09	22°14,524`	41°35,429`	MC-54	22°14,386`	41°35,208`
MC-10	22°14,491`	41°35,403`	MC-56	22°14,375`	41°35,218`
MC-11	22°14,492`	41°35,399`	MC-57	22°14,362`	41°35,222`
MC-12	22°14,480`	41°35,386`	MC-58	22°14,373`	41°35,188`
MC-13	22°14,478`	41°35,379`	MC-59	22°14,380`	41°35,203`
MC-14	22°14,470`	41°35,375`	MC-60	22°14,364`	41°35,177`
MC-15	22°14,468`	41°35,375`	MC-61	22°14,363`	41°35,358`
MC-16	22°14,465`	41°35,369`	MC-62	22°14,369`	41°35,365`
MC-17	22°14,462`	41°35,366`	MC-63	22°14,379`	41°35,373`
MC-18	22°14,458`	41°35,359`	MC-64	22°14,378`	41°35,387`
MC-19	22°14,459`	41°35,355`	MC-66	22°14,350`	41°35,389`
MC-20	22°14,455`	41°35,350`	MC-67	22°14,323`	41°35,381`
MC-21	22°14,455`	41°35,343`	MC-69	22°14,420`	41°35,466`
MC-23	22°14,451`	41°35,334`	MC-70	22°14,438`	41°35,470`
MC-24	22°14,452`	41°35,329`	MC-72	22°14,421`	41°35,481`
MC-26	22°14,446`	41°35,320`	MC-73	22°14,425`	41°35,486`

MC-27	22°14,443`	41°35,312`	MC-74	22°14,449`	41°35,107`
MC-30	22°14,433`	41°35,298`	MC-76	22°12,613`	41°35,332`
MC-31	22°14,431`	41°35,300`	MC-77	22°12,621`	41°35,332`
MC-32	22°14,427`	41°35,298`	MC-78	22°12,627`	41°35,332`
MC-33	22°14,424`	41°35,294`	MC-79	22°12,637`	41°35,328`
MC-34	22°14,425`	41°35,297`	MC-80	22°12,648`	41°35,339`
MC-36	22°14,419`	41°35,284`	MC-81	22°12,652`	41°35,337`
MC-37	22°14,420`	41°35,281`	MC-82	22°12,652`	41°35,338`
MC-38	22°14,420`	41°35,272`	MC-83	22°12,666`	41°35,337`
MC-39	22°14,418`	41°35,274`	MC-84	22°12,668`	41°35,324`
MC-40	22°14,414`	41°35,264`	MC-85	22°12,672`	41°35,327`
MC-41	22°14,410`	41°35,262`	MC-86	22°12,683`	41°35,321`
MC-42	22°14,411`	41°35,258`	MC-87	22°12,683`	41°35,316`
MC-43	22°14,406`	41°35,257`	MC-88	22°12,694`	41°35,321`
MC-44	22°14,405`	41°35,248`	MC-89	22°12,696`	41°35,323`
MC-45	22°14,406`	41°35,248`	MC-90	22°12,700`	41°35,322`
MC-46	22°14,398`	41°35,400`			