



LARISSA MÁRCIA DE SOUZA VISOTTO

**COMPARAÇÃO DE EVENTOS FENOLÓGICOS
E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Handroanthus
serratifolius* (Vahl) S.O. Grose (*Bignoniaceae*) EM
ÁREA URBANA E RURAL**

LAVRAS – MG

2015

LARISSA MÁRCIA DE SOUZA VISOTTO

***COMPARAÇÃO DE EVENTOS FENOLÓGICOS E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose
(Bignoniaceae) EM ÁREA URBANA E RURAL***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, área de concentração em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais em Ecossistemas Fragmentados e Agrossistemas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Dulcinéia de Carvalho

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Visotto, Larissa Márcia de Souza.

Comparação de eventos fenológicos e diversidade genética de
Handroanthus serratifolius (Vahl) S.O.Grose (*Bignoniaceae*) em
área urbana e rural / Larissa Márcia de Souza Visotto. – Lavras :
UFLA, 2015.

63 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientadora: Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Ipê amarelo. 2. Marcadores Moleculares. 3. Estrutura
Genética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LARISSA MÁRCIA DE SOUZA VISOTTO

***COMPARAÇÃO DE EVENTOS FENOLÓGICOS E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose
(*Bignoniaceae*) EM ÁREA URBANA E RURAL***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, área de concentração em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais em Ecossistemas Fragmentados e Agrossistemas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2015.

Dra. Rosângela Alves Tristão Borén	UFLA
Dra. Vivette Appolinário Rodrigues Cabral	UFLA
Dra. Josina Aparecida de Carvalho	UFLA
Dr. Felipe Santana Machado	UFLA

Dra. Dulcineia de Carvalho
Orientador

**LAVRAS – MG
2015**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Agradeço ao meu esposo Leandro, pelo apoio e estímulo durante esta caminhada, pela paciência com que suportou minha ausência, meus momentos de desespero e ansiedade e por me dar o melhor presente de todos: a nossa Clarinha.

Agradeço à minha mãe, Maria Helena pelo incentivo e apoio que me deu para chegar até aqui e aos meus irmãos.

A professora Dulcineia, pela orientação, dedicação e paciência com que me tratou no momento de minha gravidez.

A amiga Vivette, pela ajuda nas coletas nas análises, ensinamentos, conselhos, risadas, pela disposição em sempre me ajudar. As amigas de laboratório Rute, Joelma e Jaqueline, pela colaboração na realização deste trabalho, e aos demais amigos do laboratório de Conservação Genética pela ajuda e companheirismo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ecologia Aplicada, pela oportunidade de realização do Mestrado.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Handroanthus serratifolius (Vahl) S. O. Grose (*Bignoniaceae*), conhecida como Ipê-amarelo, é considerada uma árvore símbolo do Brasil, característica de florestas pluviais densas, secundárias e campinas da América Latina e, no Brasil ocorre, da região amazônica até o sudeste. Essa espécie tem um importante papel econômico fornecendo madeira, substâncias para a indústria farmacêutica e também para projetos de urbanização e paisagismo. A exploração indiscriminada de sua madeira pode levar à perda significativa de alelos, o que pode levar até mesmo a extinção da população. O conhecimento fenológico juntamente com o genético pode auxiliar em programas de conservação da espécie. Objetivou-se, no trabalho, analisar e conhecer a fenologia e as características genéticas da espécie, bem como sua diversidade e estrutura genética espacial, em indivíduos localizados em áreas urbana e rural. Para tanto, foram amostrados 96 indivíduos localizados em duas populações, nos municípios de Lavras/MG e Itumirim/MG, considerados população urbana e rural respectivamente. Os indivíduos foram amostrados aleatoriamente e foram apenas utilizados aqueles que apresentaram evento reprodutivo. Para as análises genéticas, foram utilizados nove *primers* ISSR, que geraram 96 bandas polimórficas. Os resultados indicam baixa diversidade genética para os indivíduos presentes em área urbana ($H_e = 0,38$) e área rural ($H_e = 0,40$). A AMOVA mostrou que existe maior diversidade dentro das populações (93,3%). A estrutura genética espacial indicou coancestria, em ambos os locais ($P > 0,05$), a distâncias abaixo de 600 e 900m, nas áreas urbana e rural, respectivamente. A fenologia apresentou sazonalidade da espécie, em relação às fenofases reprodutiva e vegetativa e eventos ocorreram de maneira sincrônica, sendo a precipitação o fator de maior influência. Na área urbana, a ocorrência das fenofases foram mais intensas, quando comparadas a área rural.

Palavras-chave: Ipê-amarelo. Marcadores moleculares. Estrutura genética.

ABSTRACT

Handroanthus serratifolius (Vahl) S. O. Grose (*Bignoniaceae*), known as yellow Ipe, is considered a symbol of Brazil, characteristic of dense and secondary rain forests, as well as of the plains of Latin America. In Brazil, its occurrence extends from the Amazon region to the southeast region. It plays an important economic role in providing wood, substances for the pharmaceutical industry, and for urbanization and landscaping projects. The indiscriminate exploitation of Ipe wood can lead to the significant loss of alleles, which can cause the extinction of its population. Phenological and genetic knowledge can assist in conservation programs for the species. This study aimed at analyzing and understanding the phenology and genetic traits of this species, such as its diversity and spatial genetic structure concerning individuals located in urban and rural areas. For this purpose, we used 96 individuals, located at two population sites within the municipalities of Lavras, Minas Gerais (MG), Brazil, and Itumirim (MG), considered urban and rural populations, respectively. Samples were randomly taken, using only those presenting reproductive event. For the genetic analyzes, nine ISSR primers generated 96 polymorphic bands. The results indicate low genetic diversity for individuals present in urban areas ($He = 0.38$) and rural areas ($He = 0.40$). The AMOVA showed that there is greater diversity within populations (93.3%). The spatial genetic structure indicated co-ancestry on both sites ($P > 0.05$), at distances of 600 and 900 m, in urban and rural areas, respectively. Phenology presented seasonality in relation to reproductive and vegetative phenophases. The events occurred in a synchronous manner, with precipitation factor being of greater influence. In the urban area, the occurrence of phenophases was more intense when compared to rural areas.

Keywords: Yellow Ipe. Molecular markers. Genetic structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Indivíduo de <i>Handroanthus serratifolius</i>	15
Figura 2	Zona urbana de Lavras onde foram amostrados os indivíduos de <i>Handroanthus serratifolius</i>	22
Figura 3	Zona rural de Itumirim onde foram amostrados os indivíduos de <i>Handroanthus serratifolius</i>	23
Figura 4	Diâmetro à altura do peito (DAP) de <i>Handroanthus serratifolius</i> amostrados em áreas urbana e rural.....	29
Figura 5	Padrão de locos produzidos neste estudo pelo <i>primer</i> JOHN em indivíduos de <i>Handroanthus serratifolius</i>	30
Figura 6	Variação de temperatura (°C) média para os meses de novembro de 2013 a outubro de 2014 na região de Lavras MG.....	31
Figura 7	Variação da umidade relativa do ar (%) média para os meses de novembro de 2013 a outubro de 2014 na região de Lavras MG.....	32
Figura 8	Variação de precipitação (mm) média para os meses de novembro de 2013 a outubro de 2014 na região de Lavras MG.....	32
Figura 9	Índice de intensidade para floração de <i>Handroanthus serratifolius</i> para as populações urbana e rural.....	34
Figura 10	Índice de intensidade para frutificação de <i>Handroanthus serratifolius</i> para as populações urbana e rural.....	34
Figura 11	Índice de intensidade para copa de <i>Handroanthus serratifolius</i> para as populações urbana e rural.....	35
Figura 12	Índice de atividade para floração de <i>Handroanthus serratifolius</i> para as populações urbana e rural.....	35
Figura 13	Índice de atividade para frutificação de <i>Handroanthus serratifolius</i> para as populações urbana e rural.....	36

Figura 14	Índice de atividade para copa de <i>Handroanthus serratifolius</i> para as populações urbana e rural.	36
Figura 15	Relação entre precipitação e floração para áreas urbana e rural de indivíduos de <i>Handroanthus serratifolius</i>	37
Figura 16	Relação entre precipitação e copa para áreas urbana e rural <i>Handroanthus serratifolius</i>	38
Figura 17	Histograma circular de floração para população urbana de <i>Handroanthus serratifolius</i>	42
Figura 18	Histograma circular de floração para população rural de <i>Handroanthus serratifolius</i>	42
Figura 19	Histograma circular de frutificação para população urbana de <i>Handroanthus serratifolius</i>	43
Figura 20	Histograma circular de frutificação para população rural de <i>Handroanthus serratifolius</i>	43
Figura 21	Histograma circular de copa para população urbana de <i>Handroanthus serratifolius</i>	44
Figura 22	Histograma circular de copa para população rural de <i>Handroanthus serratifolius</i>	44
Figura 23	Correlograma de coancestria para indivíduos de <i>Handroanthus serratifolius</i> na população rural.	48
Figura 24	Correlograma de coancestria para indivíduos de <i>Handroanthus serratifolius</i> na população urbana.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> ISSR selecionados para amplificação de DNA genômico de <i>Handroanthus serratifolius</i> . R= (A,G); Y= (A,C,G).....	30
Tabela 2	Correlação de Spearman entre os índices de atividade e intensidade para fenofase frutificação de <i>Handroanthus serratifolius</i> com as variáveis climáticas precipitação e umidade relativa do ar no período de novembro/13 a outubro/14.	39
Tabela 3	Correlação de Spearman entre os índices de atividade e intensidade para fenofase copa de <i>Handroanthus serratifolius</i> com as variáveis climáticas precipitação e umidade relativa do ar no período de novembro/13 a outubro/14.....	39
Tabela 4	Correlação de Spearman entre os índices de atividade e intensidade para fenofase floração de <i>Handroanthus serratifolius</i> com as variáveis climáticas precipitação e umidade relativa do ar no período de novembro/13 a outubro/14.	40
Tabela 5	Análises estatísticas circular dos eventos fenológicos de <i>Handroanthus serratifolius</i> , referentes aos eventos no período de nov/13 a out/14, com valores de probabilidade (p) com intervalo de confiança de 95%	41
Tabela 6	Estimativas genéticas das populações urbana e rural de <i>Handroanthus serratifolius</i> . Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; I: índice de Shannon; He: diversidade genética de Nei; P: porcentagem de locos polimórficos.....	46

Tabela 7	AMOVA em duas populações de <i>Handroanthus serratifolius</i> . GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados dos desvios; FST: índice de fixação.....	47
Tabela 8	Caracterização da estrutura espacial de <i>Handroanthus serratifolius</i> . Fij: coeficiente de Kinship para primeira classe de distância; Blog: inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria; Sp: estatística usada para o cálculo da magnitude da estrutura genética espacial; P: valor de significância	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	<i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.O. Grose (<i>Bignoniaceae</i>)	14
2.2	Diversidade e Estrutura Genética	15
2.3	Marcadores ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)	18
2.4	Fenologia	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Área de Estudo	22
3.2	Amostragem.....	23
3.3	Fenologia	24
3.4	Aspectos genéticos	25
3.4.1	Extração do DNA Genômico.....	25
3.4.2	Análises de Dados Genéticos	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	Caracterização diamétrica	29
4.2	Seleção de <i>primers</i>	29
4.3	Eventos fenológicos.....	31
4.4	Diversidade Genética	45
4.5	Estrutura Genética das Populações	47
4.6	Estrutura Genética Espacial	48
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6	CONCLUSÕES.....	51
7	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Handroanthus serratifolius (Vahl) S. O. Grose (*Bignoniaceae*), também conhecido como Ipê-amarelo ou Pau d'arco amarelo, pertence à família Bignoniaceae. Por muito tempo, a espécie foi considerada como pertencente ao gênero *Tabebuia*, no entanto após a realização de estudos de filogenia molecular passou a ser considerada como *Handroanthus* (OLMSTEAD; GROSE, 2007).

A espécie é amplamente encontrada nos domínios fitogeográficos brasileiros (Amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica e pantanal), característica das florestas pluviais densas até altitudes de 1200m, ocorrendo também em florestas secundárias.

O Ipê-amarelo é considerado uma árvore símbolo do Brasil, com potencial de uso no reflorestamento de áreas degradadas e na ornamentação, além de possuir propriedades medicinais (VIDAL-TESSIER, 1988). Sua madeira é empregada em marcenaria, construções pesadas e estruturas externas, tanto civis quanto navais. A árvore é amplamente utilizada em paisagismo e arborização urbana devido à beleza de sua floração.

Com o rápido crescimento das atividades humanas, a expansão agropecuária e industrial, as áreas de ocorrência do Ipê-amarelo foram e continuam sujeitas à destruição e fragmentação de hábitat. Esse processo reduz a biodiversidade e coloca em risco a estabilidade de populações nativas, pois leva à sua diminuição ou até mesmo à extinção, pela perda de diversidade genética.

Ações de conservação de espécies requerem conhecimentos ecológicos e genéticos. A quantificação da estrutura genética das populações e a identificação do comportamento reprodutivo das espécies são parâmetros norteadores de medidas de conservação. A fenologia estuda a ocorrência de eventos repetitivos e sua relação com o meio biótico e abiótico, buscando esclarecer a sazonalidade dos fenômenos biológicos (MORELLATO; LEITÃO FILHO, 1990). Esse

estudo é essencial para o conhecimento da ecologia e da evolução da dinâmica dos ecossistemas florestais, o que permite obter informações sobre a sazonalidade de seus eventos biológicos e também de fatores ecológicos, como: migração de aves, período reprodutivo de animais e atividades de insetos.

A fenologia caracteriza-se como um requisito básico para monitorar, gerir e conservar os ecossistemas (NEWSTRON et al., 1994) e, em meio ao cenário climático global, compreender como os processos fenológicos ocorrem e evoluem. É fundamental diante das mudanças iminentes e suas consequências, em relação aos ambientes naturais e produtivos (ELZINGA et al., 2007; MORELLATO, 2007).

O estudo da estrutura genética de populações é realizado com marcadores moleculares, o que possibilita avanços nos estudos de espécies arbóreas, principalmente para descrever a organização da variabilidade genética em populações naturais (VIEIRA; CARVALHO, 2008). Estes estudos são importantes para conservação e manejo florestal, pois este conhecimento gera melhor compreensão da estruturação das populações e garante a perpetuação da espécie.

Diante dos argumentos, o presente trabalho, utilizando-se de marcadores moleculares baseados em sequências repetidas (*Inter Simple Sequence Repeats*) ISSR e dados de fenologia da espécie, objetivou analisar e conhecer a diversidade genética e a estrutura genética espacial de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose (*Bignoniaceae*) e seus aspectos fenológicos, nos ambientes urbano e rural.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose (*Bignoniaceae*)

Comumente conhecida como Ipê-amarelo ou Pau d'arco, a espécie pertence à família das *Bignoniaceae*, é também considerada árvore símbolo do Brasil e do município de Lavras que é conhecida como a Cidade das Escolas e dos Ipês. A espécie foi classificada como *Tabebuia serratifolia*, entretanto estudos de filogenia molecular a classificaram como *Handroanthus serratifolius* (OLMSTEAD; GROSE, 2007).

A espécie é encontrada nos países da América Latina e, no Brasil, ocorre nas regiões Amazônica, Nordeste, até a região Sudeste. *Handroanthus serratifolius* é característica das florestas de terra firme, floresta estacional perenifólia, floresta ombrófila e floresta ombrófila densa (LOHMANN, 2015). As árvores são normalmente encontradas em áreas de borda ou isoladas em áreas abertas, como as pastagens (Figura 1).

São árvores de médio porte com tronco esguio e casca grossa, bastante utilizadas para fins madeireiros (como na construção civil, naval e moveleira), paisagismo, reflorestamento de áreas degradadas e propósitos medicinais (VIDAL-TESSIER, 1988; RODRIGUES; MARTINS; BARROS, 2004; AWALE et al., 2005).

Apresentam folhas compostas de margem serrilhada, corola tubular, fruto tipo cápsula linear e em sua casca e caule são encontradas substâncias que apresentam características antibacterianas (PARK et al., 2005), antitumorais (CHENNA et al., 2001), fungicidas (PORTILLO et al., 2001).

O ipê-amarelo é uma árvore com folhagem do tipo decídua, já que perde suas folhas no período do inverno e elas reaparecem logo após a floração o que ocorre por volta do mês de outubro. Produz uma grande quantidade de sementes

aladas (LORENZI, 1992) que, no entanto, apresentam problemas de germinação e de conservação (OLIVEIRA et al., 2004).



Figura 1 - Indivíduo de *Handroanthus serratifolius*.

2.2 Diversidade e Estrutura Genética

A diversidade genética é essencial para a sobrevivência das espécies. Essa diversidade é resultante de mecanismos que atuam diretamente nas trocas genéticas, que agem no descarte das mal preparadas ou mal formadas e favorecem o aumento das populações mais adaptadas ao ambiente. O meio de ação desses mecanismos são as variantes internas dentro das populações, que criam diferenciações, criando variabilidades entre as espécies (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995).

Perdas de diversidade ocorrem com frequência e por vários fatores, por exemplo, deriva genética, endogamia e seleção natural (NEI, 1987). Este cenário é alvo dos estudos da genética da conservação, que baseia o uso da teoria e das

técnicas da genética, para redução do risco de extinção das espécies ameaçadas para preservar a biodiversidade. A perda da variabilidade é seu tema central, pois, populações pequenas, (especialmente de espécies alógamas), que ocorrem em áreas fragmentadas podem sofrer depressão por endogamia, levando à perda de heterozigosidade, de diversidade genética e da adaptabilidade (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

As espécies arbóreas são suscetíveis a vivenciar diferentes alterações no clima e condições ambientais, tornando imperativo o estudo de sua diversidade genética, que é a fonte de sua resistência aos ambientes (HAMRICK, 1983). Este estudo deve vislumbrar o levantamento da probabilidade de adaptação da espécie às possíveis condições ambientais hostis. Os estudos destas variabilidades genéticas são a base para as ações eficientes de conservação (YEEH; KANG; CHUNG, 1996). As florestas tropicais contemplam enorme diversidade de espécies e plurais sistemas de reprodução que se relacionam com diversos tipos de agentes polinizadores e de dispersores de sementes (GROSS, 2005; MACHADO; LOPES, 2004). Constata-se que as espécies arbóreas tendem a possuir relativa vantagem se comparadas a outras plantas, ou animais, em se tratando de variações genéticas (SOULÉ, 1986).

A estrutura genética é a forma pela qual a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma população (BROWN, 1978). Esta última que é definida como a distribuição não aleatória dos alelos e genótipos (HAMRICK; GODT, 1990), pode ser verificada entre grupos progênes, entre populações geográficas distintas ou grupos locais.

Os processos microevolutivos como mutação, migração, deriva genética e seleção atuam dentro de espécies influenciando sua estrutura genética, interferindo na distribuição heterogênea, ou seja, não aleatória, dos alelos e dos genótipos no espaço e no tempo (HAMRICK, 1982). Desconsiderando-se fatores como processos meióticos ou a organização do genoma como potenciais

variáveis das frequências alélicas. Fatores ecológicos como o ambiente, a densidade populacional, as relações entre indivíduos e as populações locais, o sistema de reprodução, os mecanismos de polinização, a dispersão e dormência das sementes, o ciclo de vida, o estágio sucessional, a fenologia, o tamanho e a distribuição espacial das populações afetam diretamente a estrutura genética de populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). A heterogeneidade entre as populações se deve à seleção e à deriva genética, tendo como força contrária o fluxo gênico (HAMRICK; GODT, 1990). É caracterizada também por fatores genéticos como a variabilidade morfológica e quantitativa dentre os indivíduos, sistema reprodutivo, padrões de fluxo gênico e adaptabilidade ambiental (MARTINS, 1987).

O teorema de Hardy-Weinberg, que é referência nos estudos de estrutura genética, expõe que, ao se realizarem cruzamentos ao acaso em uma população de tamanho infinito, ao longo da passagem das gerações, as frequências gênicas e genóticas permanecerão constantes, desde que não ocorra migração, seleção ou deriva. Assim, calcula-se teoricamente a frequência de determinado genótipo, independente da quantidade de alelos existentes (FUTUYMA, 1992).

De acordo com Hamrick e Godt (1996), o estudo da variabilidade genética, dentro de uma espécie, leva não só a um enriquecimento do conhecimento genético, mas também a uma possível compreensão dos processos históricos ligados à sua evolução. O aprofundamento nessas análises é fundamental para embasar possíveis ações de conservação e de mudanças evolutivas, auxiliando no manejo eficiente dos recursos das populações naturais, além de produzir evidências de sua história evolutiva (WEIR, 1990). No caso das espécies arbóreas, esses conhecimentos se elevam em importância das florestas tropicais, por elas se constituírem como elementos base do ecossistema, já que possuem maior longevidade e sua variabilidade genética favorece a todo o ecossistema, na resistência a fatores desfavoráveis (BARREIRA, 2005).

2.3 Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Em meados dos anos 1990, a análise da estrutura e diversidade genética elevou exponencialmente suas potencialidades devido à difusão dos métodos moleculares baseados na amplificação da sequência do DNA (HOLDEREGGER; KAMM; GUGERLI, 2006). Esse progresso possibilita a decodificação genética de grandes volumes amostrais de indivíduos e populações de várias espécies distintas de vegetais, auxiliando o entendimento de padrões de fluxo gênico, de dispersão e seleção (ROLDAN RUIZ et al., 2000).

O custo, a simplicidade de uso, a tecnologia, a repetibilidade, a capacidade de diferenciação entre os indivíduos, espécie, modo de herança codominante ou dominante são exemplos das diferenças entre os marcadores (AGOSTINI, 2008). Estas diferenças são consideradas para escolha do tipo de marcador que melhor se adequará aos objetivos da investigação.

Um marcador molecular muito utilizado em genética de populações são os chamados SSR (sequências simples repetidas), também conhecidas como microssatélites. Estes são constituídos de pequenas sequências de nucleotídeos de uma a seis bases, repetidas em *tandem* e dispersas aleatoriamente no genoma de eucariotos. Para a utilização eficiente deste tipo de marcador é necessário conhecimento prévio da sequência que flanqueia os microssatélites para a construção dos *primers* usados nas reações PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) (LIU; WENDEL, 2001). Para contornar essa questão, Zietjiewicz, Rafalski e Labuda (1994) desenvolveram os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), que são marcadores baseados em SSR, em que se utilizam de sequências complementares aos próprios SSRs como *primers*.

O ISSR é um marcador classificado como semiarbitrário, tendo ao final de sua sequência 3' ou 5' de 1 a 4 bases de purina ou pirimidina, com um

dinucleotídeo parcialmente degenerado (SOUZA et al., 2005; LIU; WENDEL, 2001). Segundo Fang e Roose (1997), as seqüências-alvo dos ISSR existem, em grande número ao longo do genoma de eucariotos e assim como os SSRs, podem amplificar as regiões onde a enzima *Taq polimerase* atua, produzindo grandes quantidades de fragmentos polimórficos (GE; SUN, 2001; NARZARY; RANA; RANADE, 2010) e evoluem com bastante rapidez, fato que os torna especialmente interessantes para a genética de populações. O uso destes marcadores ISSR é cada vez mais utilizado nos estudos de populações de plantas, fungos, insetos e vertebrados (WOLFE, 2005; NASCIMENTO et al., 2010; FARJADO; VIEIRA; MOLINA, 2014; BARBOSA; FREITAS; MORALES, 2014; SILVA et al., 2014), pois estes possuem evidentes vantagens – algumas já elencadas – como menor custo, dispensa de informações prévias do genoma, resultado mais amplo em marcadores polimórficos, maior rapidez, facilidade técnica e ainda podem ser usados com maior aplicabilidade taxonômica (SU; WANG; OUYANG, 2009; ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Os marcadores *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e ISSR possuem protocolos de amplificação e análise de dados muito similares, porém o ISSR suporta maiores temperaturas de anelamento, gerando maior reprodutibilidade dos fragmentos amplificados e apresenta maior superfície de ancoragem, com seqüências mais longas e conseqüente robustez nos resultados (WOLFE, 2005; QIAN et al., 2001; BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011).

Holsinger, Lewis e Dey (2002) desenvolveram a abordagem bayesiana, que consiste na separação das variações genéticas com dados derivados de marcadores dominantes. Esta abordagem minimiza o caráter dominante dos marcadores ISSR. Os efeitos desta espécie de marcador, ou seja, os genótipos heterozigotos, não são detectados pelo índice de diversidade de Shannon (Dawson et al., 1995; ; SU; WANG; OUYANG, 2009), que baseia-se na

frequência do fragmento amplificado (ausência ou presença), na população (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011).

2.4 Fenologia

A fenologia é o estudo da ocorrência de eventos biológicos repetitivos, bem como as causas de sua ocorrência em relação aos fatores bióticos e abióticos. Também analisa as inter-relações entre as fases caracterizadas por esses eventos para uma ou mais espécies (LIETH, 1974). A fenologia pode fornecer informações relevantes sobre a interação das plantas com seu ambiente.

O estudo da fenologia representa uma ótima ferramenta para o entendimento dos fatores que influenciam a reprodução e a sobrevivência das espécies vegetais (MORELLATO et al. 2000, 2010). As plantas apresentam estratégias fenológicas relacionadas às características ambientais de seus habitats, ao seu hábito, biologia reprodutiva e modo de dispersão (CONCEIÇÃO; FUNCH; PIRANI, 2007). Camacho e Orozco (1998) ressaltaram que, com a ampliação e a compreensão dos padrões fenológicos das espécies arbóreas nos ecossistemas naturais e suas interações, é possível gerar conhecimento para programas de conservação de recursos genéticos e auxiliar no planejamento de restauração de ecossistemas.

Os estudos fenológicos são importantes para a compreensão da dinâmica das comunidades florestais e servem como indicadores das respostas destes organismos às condições climáticas e edáficas (FOURNIER, 1974). A sujeição a diferenças destas condições pode alterar a dinâmica e estruturação das comunidades, podendo tornar crítica a condição de sobrevivência e de reprodução das plantas (RATHCKE; LACEY, 1985) e animais que dependem destas para subsistência. Indivíduos detentores de papéis fundamentais como herbívoros, polinizadores e dispersores, são diretamente atingidos por tais

situações, que podem influir inclusive em suas histórias evolutivas (JUSTINIANO; FREDERICKSEN, 2000; TALORA; MORELLATO, 2000); essa compreensão é de fundamental importância para conservação e manejo de espécies nativas e ameaçadas (OLIVEIRA, 2008).

O monitoramento fenológico é realizado por meio de observações sistemáticas do ciclo de vida das plantas, que compreendem suas fenofases vegetativas, que envolvem o brotamento e a queda foliar e as fases reprodutivas como a floração e a frutificação (BENCKE; MORELLATO, 2002a). As alterações nos eventos fenológicos pode ser um sinal de variações climáticas importantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

Para avaliar os efeitos do ambiente de ocorrência de *Handroanthus serratifolius* sobre a diversidade e eventos fenológicos foram analisados e comparados indivíduos de duas localidades, chamados de rural e urbana. A população rural localiza-se nas coordenadas 21°24'27''S e 44°79'15''W, no município de Itumirim/MG e foi assim designada por apresentar: áreas de plantações de culturas anuais, pastagens e pequenas áreas com corredores e fragmentos de mata nativa (Figura 2).

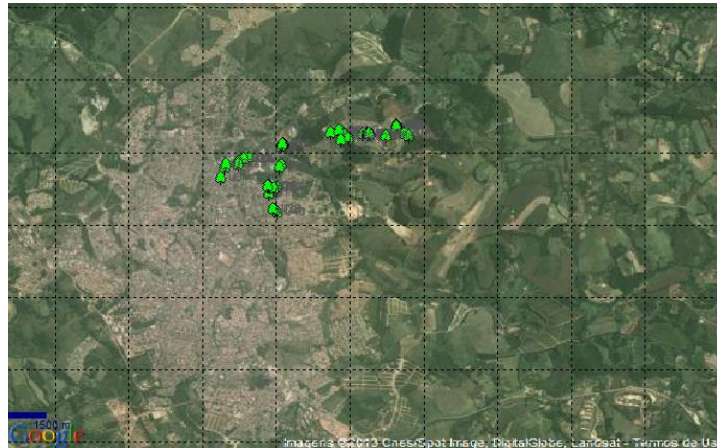


Figura 2- Zona urbana de Lavras onde foram amostrados os indivíduos de *Handroanthus serratifolius*

A população urbana está localizada nas coordenadas 21°22'85''S e 44°97'99''W, no município de Lavras/MG, no campus da UFLA e suas imediações. Essa área é bastante urbanizada e sofre interferência constante das ações humanas (Figura 3).

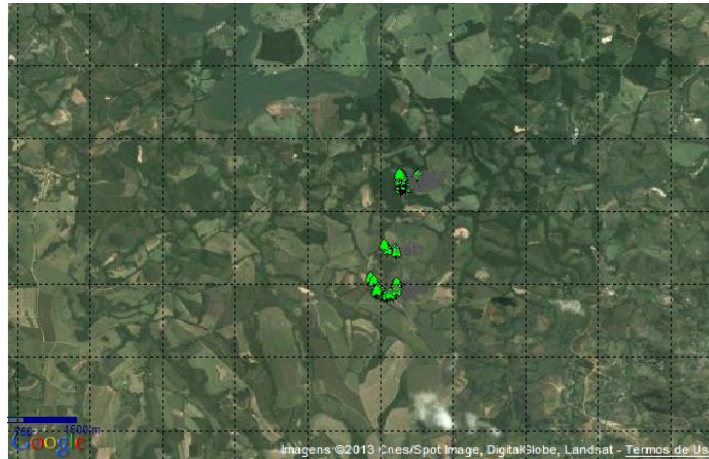


Figura 3 - Zona rural de Itumirim onde foram amostrados os indivíduos de *Handroanthus serratifolius*.

O clima da região é classificado como Cfb, é considerado ameno com precipitação anual superior a 3.300mm (ALVARES et al.,2014).

3.2 Amostragem

Para as análises dos eventos fenológicos foram selecionados 96 indivíduos, sendo que 48 indivíduos eram da área urbana e 48 da área. Todos os indivíduos foram identificados e georreferenciados com o aparelho GPS (E-TREX Legend HC-x Garmin), e tiveram registradas as medidas de diâmetro à altura do peito (DAP).

Para a realização dos estudos da diversidade genética foram coletadas amostras foliares de todos os indivíduos das áreas urbana e rural, relacionados na descrição dos estudos de eventos fenológicos. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, contendo sílica, e levadas ao Laboratório de Conservação Genética, para serem mantidas sob refrigeração.

3.3 Fenologia

As observações dos eventos fenológicos foram realizadas em todos os indivíduos amostrados, mas apenas foram utilizadas para as análises aquelas que, durante o período total de estudo, apresentaram, ao menos um evento reprodutivo, assegurando-se, assim, que todos os indivíduos eram reprodutivos.

O acompanhamento fenológico foi realizado por visitas quinzenais, durante o período de um ano, que foi de novembro de 2013 até outubro de 2014 e foram observados os seguintes eventos: folhas jovens, folhas maduras, botão floral, inflorescência, fruto imaturo e fruto maduro.

Como método de avaliação foram utilizados índices de atividade e de intensidade (método de Fournier). No índice de atividade é constatada somente a presença ou ausência da fenofase no indivíduo. Esse método tem caráter quantitativo a nível populacional, capaz de estimar se há ou não sincronia entre os indivíduos, considerando que, quanto maior o número de indivíduos manifestando a fenofase ao mesmo tempo, maior é a sincronia (BENCKE; MORELLATO, 2002b). No método de Fournier, os valores são obtidos em campo mediante uma escala intervalar semiquantitativa de cinco categorias (0 a 4), com intervalo de 25% entre cada categoria, o que permite estimar a porcentagem de intensidade da fenofase, em cada indivíduo (FOURNIER, 1974; BENCKE; MORELLATO, 2002a).

A correlação de Spearman (ZAR, 1999) foi utilizada para análise das fenofases, a fim de se verificar a influência das variáveis ambientais umidade relativa e precipitação sobre os eventos fenológicos, nos índices de atividade e intensidade, considerando que os dados não são paramétricos. Com os dados climatológicos, obtidos através do banco de dados da Universidade Federal de Lavras, referentes ao período de estudo, correlacionaram-se aos dados fenológicos.

Também foram utilizadas análises de dados circulares para testar a ocorrência de sazonalidade nas fenofases, onde os dias do ano são convertidos em ângulos (0-360°), sendo que cada mês equivale a 30°; a frequência de ocorrência da fenofase na população é então relacionada ao ângulo correspondente e são calculados a direção e tamanho do vetor médio, a variância circular ou dispersão do vetor médio (r) e a conversão do ângulo médio em data média (FISHER, 1993). O teste de Rayleigh (z) é então aplicado para verificar se há uma distribuição uniforme do evento ou se este apresenta sazonalidade. Quando a sazonalidade foi significativa para o evento, no período avaliado, o teste F de Watson-Williams foi aplicado para avaliar se os eventos são sincrônicos (ZAR, 1999; MORELLATO et al., 2000). O mesmo teste foi aplicado para verificar a ocorrência de sincronia dos eventos entre as condições, quando estas apresentavam sazonalidade significativa (ZAR, 1999). O vetor r pode variar de 0 a 1, sendo 0 não sazonal e 1 altamente sazonal.

O software Oriana 4.01 (KOVACH, 2013) foi utilizado para as análises estatísticas circulares, e para correlacionar dados fenológicos e dados genéticos, utilizou-se o software Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007).

3.4 Aspectos genéticos

3.4.1 Extração do DNA Genômico

Com algumas modificações, para a extração do DNA foi utilizado o protocolo do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Nesse método, foram utilizadas entre 150 e 200 mg de tecido foliar de cada indivíduo para maceração em almofariz, utilizando polivinilpirrolidona (PVP insolúvel). Foram adicionados 800 μ L de tampão de extração pré- aquecido a 65°C. O tampão constitui-se de 2% de CTAB (Cetyl trimethylammonium Bromide), Tris HCL 1M (pH 8,0), EDTA

(*ethylenediaminetetracetate*) 0,2 M (pH 8,0), NaCl 1,4 M, 1% PVP (40) e 0,2 % de β -mercaptoetanol. Após a maceração, o material foi colocado em tubos de 2 ml devidamente identificados, homogeneizado e colocados em banho-maria por 60 minutos a 65°C, com agitações periódicas, em intervalos de 10 minutos. Nesta primeira etapa, ocorre a solubilização das membranas celulares.

A primeira extração dos ácidos nucleicos foi realizada com 600 μ L de solvente orgânico clorofórmio álcool isoamílico, na proporção de 24 partes de clorofórmio para uma parte de álcool isoamílico (24:1). Em seguida, os tubos foram agitados manualmente, durante 5 minutos. As amostras foram colocadas em centrifugação (12.000 rpm), por 10 minutos, separando-se a fase orgânica da fase aquosa. O sobrenadante (fase aquosa superior) foi retirado, e transferido para novo tubo, no qual se adicionaram 60 μ L de solução 10% CTAB e 1,4 M NaCl. Após homogeneização, nova extração com 600 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi feita e as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 minutos. A nova fase aquosa superior foi transferida para novo tubo, adicionando-se 450 μ L de isopropanol gelado e deixado para precipitar (*overnight*) no freezer.

Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. Posteriormente, formou-se um *pellet* visível contendo o DNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 100 μ L de etanol 70%, por 5 minutos. Após nova centrifugação (10.000 rpm, por 5 minutos), o etanol foi descartado. O *pellet* foi lavado novamente com etanol a 100%, por 5 minutos. Após a lavagem, as amostras foram expostas em temperatura ambiente até total evaporação do etanol. O DNA foi ressuscitado em 100 μ L de solução TE (1% v/v Tris-HCL 1M pH 8,0 e 0,2% v/v de EDTA 0,5 M pH 8,0 com água ultrapura autoclavada). As amostras de DNA foram acondicionadas em freezer a -20°C. Foram feitas diluições padronizadas em

todas as amostras para realização da reação de amplificação, pegando-se 1 µL do DNA ressuspendido e adicionando-se 100 µL de TE (diluição 1:100).

Foram testados 14 *primers* ISSR em 12 amostras provenientes das duas populações. Verificou-se o perfil de amplificação de cada *primer* em gel de agarose após eletroforese. Dentre os *primers* testados, nove foram selecionados por apresentarem melhor amplificação e um número maior de fragmentos com boa resolução.

As reações foram preparadas em placas para PCR, aplicando em cada poço uma alíquota de 2 µL de DNA diluído (1:100) e à essas amostras foi acrescentado 10 µL de mix para PCR. As reações foram conduzidas em termociclador, onde as amostras sofreram desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguidos de 37 ciclos de amplificação e cada ciclo constituiu-se de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C e 1 minuto a 72°C; no final do último ciclo a extensão foi de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (5 mg/mL). As corridas foram realizadas em cuba horizontal, mergulhadas em TBE 0,5X por um período de 1 hora e 30 minutos, à 90V. Para estimar o tamanho molecular dos fragmentos utilizou-se marcador molecular de DNA – ladder de 1 kb. Posteriormente, os géis foram fotografados em luz ultravioleta; a partir da imagem registrada os dados foram interpretados pela presença (1) ou ausência (0) de fragmentos.

3.4.2 Análises de Dados Genéticos

Os parâmetros de diversidade genética estimados foram a porcentagem de locos polimórficos (P), o número de alelos efetivos (ne) (KIMURA; CROW, 1964), o número de alelos observados (na), a diversidade genética de Nei (He) (NEI, 1978), o índice de Shannon (I) (LEWONTIN, 1972) e o fluxo gênico

(Nm), onde para dados dominantes considera-se que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes parâmetros foram calculados, usando o programa POPGENE (v. 1.32) (YEH et al,1997).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi estimada por meio do programa ARLEQUIN v.3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2010), para determinar a estruturação da variabilidade genética dentro e entre as populações. Uma das vantagens dessa análise é que ela não pressupõe o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que, para o cálculo foi utilizado o coeficiente dos quadrados das distâncias euclidianas, que é similar às análises de Excoffier, Smouse e Quattro (1992) e Nybom (2004). A significância dos componentes da variância é testada através de permutações.

Para conhecer a estrutura genética espacial das populações foi utilizado o software SPAGEDI v.1.2, onde se estima a probabilidade de identidade dos alelos em genes homólogos, amostrados da mesma maneira. Para se estimar o valor de coancestria, utiliza-se o coeficiente de *kinship* entre os pares de indivíduos para as classes de distância (HARDY; VEKEMANS, 2002). A extensão da estrutura genética espacial foi estimada usando a estatística S_p (VEKEMANS; HARDY, 2004), em que os valores foram utilizados para comparar a extensão da estrutura genética espacial das populações.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização diamétrica

Foram mensurados os valores de DAP (diâmetro a altura do peito) dos indivíduos de *Handroanthus serratifolius* nas populações urbana e rural (Figura 4). A população rural apresentou DAP maior se comparado à população urbana, onde os DAP foram menores. O maior DAP foi de 76 cm para população rural e 60 cm para população urbana e o menor foi de 9 cm para população urbana e 26 cm para população rural.

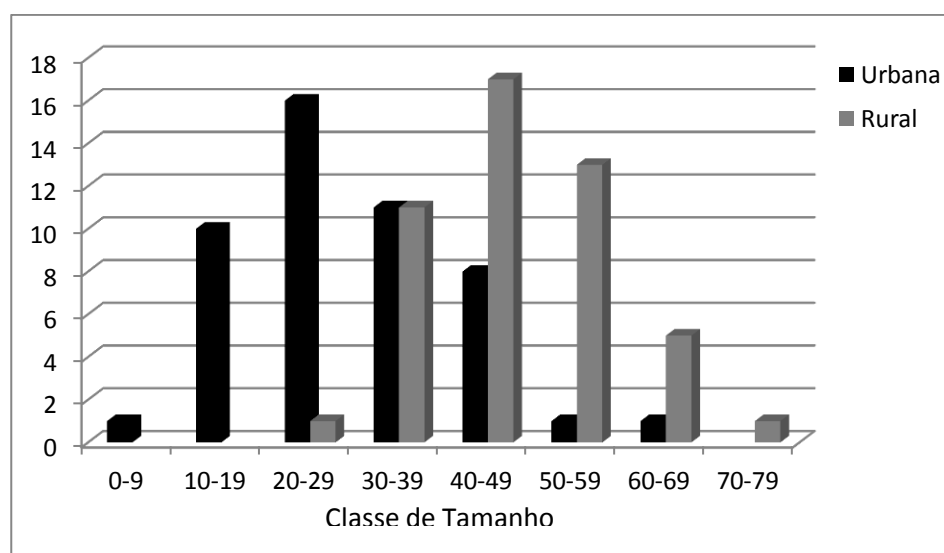


Figura 4 - Diâmetro à altura do peito (DAP) de *Handroanthus serratifolius* amostrados em áreas urbana e rural.

4.2 Seleção de primers

Para o estudo de diversidade de *Handroanthus serratifolius* foram testados 14 primers ISSR, dentre eles nove foram selecionados por apresentarem melhor amplificação (Tabela 1). Houve uma variação na geração de bandas com

os *primers* utilizados, com 17 bandas pelo *primer* MANNY e 4 bandas pelo *primer* UBC 827, sendo que a média de bandas foi 11. Essa variação no número de bandas gerado é comum, pois mostra que alguns *primers* são mais eficientes em detectar as sequências para a amplificação.

Tabela 1 - *Primers* ISSR selecionados para amplificação de DNA genômico de *Handroanthus serratifolius*. R= (A,G); Y= (A,C,G).

Primer	Sequência (5' - 3')	Número de bandas
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	11
UBC 827	ACACACACACACACACG	4
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	6
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	12
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	10
UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	15
UBC 881	GGG TGG GGT GGG GTG	11
MANNY	CAC CACCACCACRC	17
JOHN	AGA GAG AGA GAG AGY C	10
Total		96

A Figura 6 ilustra o padrão de bandas gerado para os indivíduos de *H. serratifolius*.

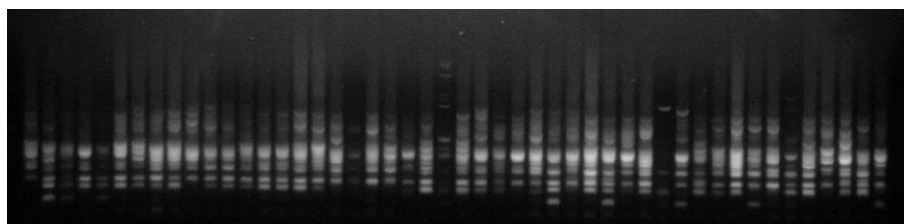


Figura 5 - Padrão de locos produzidos neste estudo pelo *primer* JOHN em indivíduos de *Handroanthus serratifolius*.

4.3 Eventos fenológicos

A temperatura média mensal teve uma considerável amplitude de variação, onde a temperatura mínima foi de 17,2°C, no mês de julho e a temperatura máxima foi de 24,9°C, no mês de abril. A variação durante o período analisado foi de 7,7 °C (Figura 6).

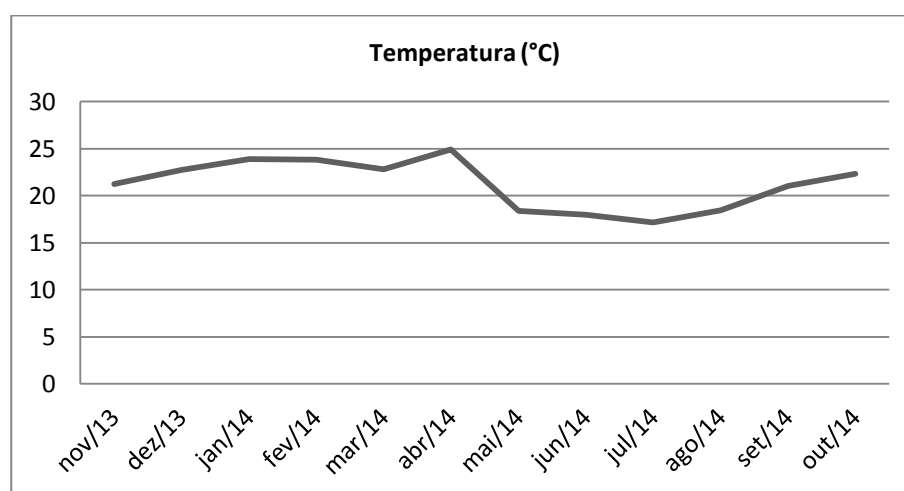


Figura 6 - Variação de temperatura (°C) média para os meses de novembro de 2013 a outubro de 2014 na região de Lavras MG.

No período de novembro de 2013 a outubro de 2014, a variação da umidade relativa do ar foi de 25,6%. O mês que apresentou maior taxa de umidade relativa foi dezembro de 2013, de 78% e o mês que apresentou menor taxa foi outubro de 2014 de 52,4% (Figura 7).

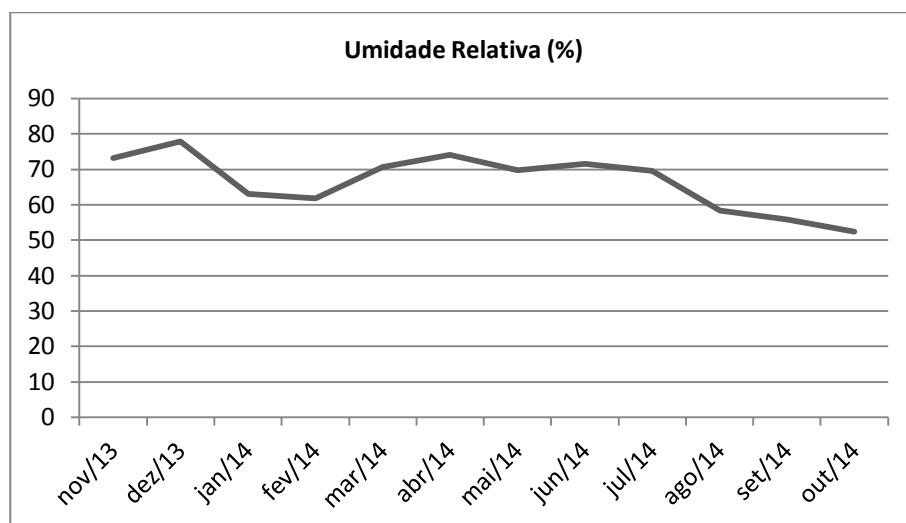


Figura 7 - Variação da umidade relativa do ar (%) média para os meses de novembro de 2013 a outubro de 2014 na região de Lavras MG

A variação de precipitação foi mais alta no mês de Janeiro de 2014, com 800mm e menor no mês de Junho de 2014, com 10mm (Figura 8).

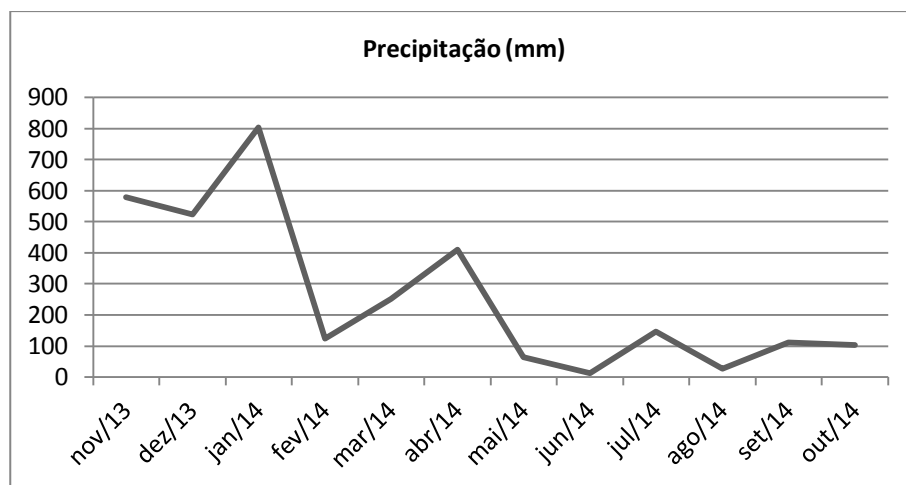


Figura 8 - Variação de precipitação (mm) média para os meses de novembro de 2013 a outubro de 2014 na região de Lavras MG.

Para todos os eventos fenológicos, os índices de atividade e de intensidade mostraram padrões semelhantes (Figuras 9 a 14). A fenofase floração apresentou pico no mês de setembro, para os indivíduos da população urbana e pico no mês de agosto, para os da população rural, no entanto a magnitude foi maior para os indivíduos da população urbana, para os índices de atividade e de intensidade. Para a fenofase frutificação, o pico ocorreu no mês de outubro para população urbana e também para a rural com maior magnitude para a população urbana, para ambos os índices utilizados. A copa dos indivíduos das populações urbana e rural apresentaram maior ocupação foliar no mês de dezembro de 2013, tanto para o índice de intensidade, quanto para o de atividade. Considerando os resultados obtidos em observações realizadas por Morellato et al. (2000) de que indivíduos arbóreos apresentaram picos de brotamento em meses mais quentes e úmidos, pode-se concluir que o aumento na disponibilidade de água e temperatura induziram o brotamento dos indivíduos.

Os indivíduos da população urbana apresentaram maior intensidade na ocorrência das fenofases, quando comparados aos da população rural. Roetzer et al. (2000) quantificou os impactos adicionais do aquecimento urbano às recentes mudanças climáticas pela comparação fenológica entre áreas urbana e rural no período de 1951-1995. Áreas urbanas apresentaram tendências em antecipar os eventos de floração em 2 – 4 dias, em relação às áreas rurais. White et al. (2002), utilizando imagens de satélite também verificaram que áreas urbanas têm apresentado um adiantamento do desencadeamento de eventos reprodutivos, em relação às áreas rurais.

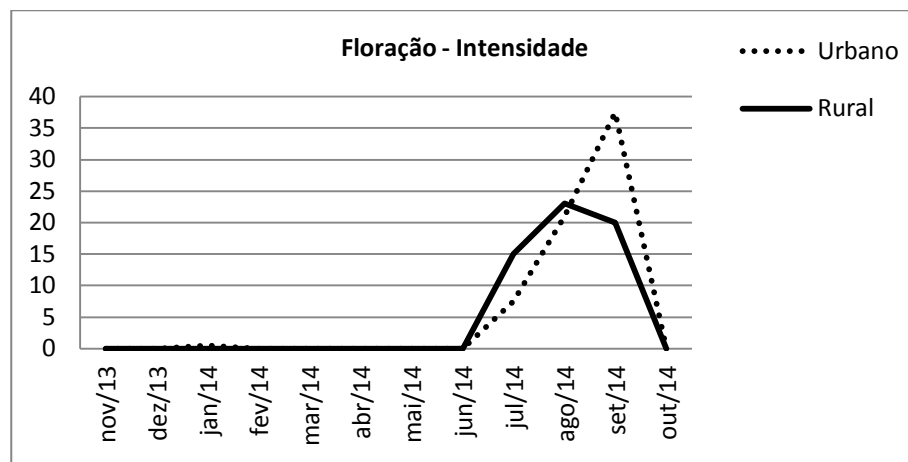


Figura 9 - Índice de intensidade para floração de *Handroanthus serratifolius* para as populações urbana e rural

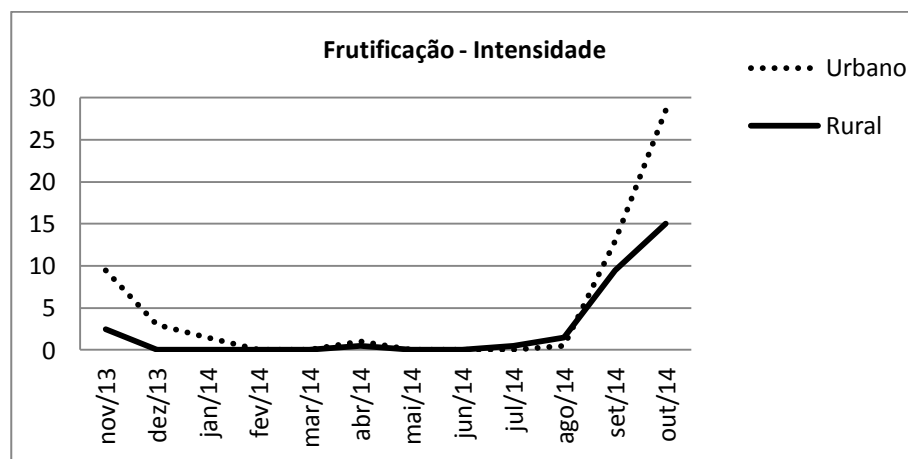


Figura 10 - Índice de intensidade para frutificação de *Handroanthus serratifolius* para as populações urbana e rural

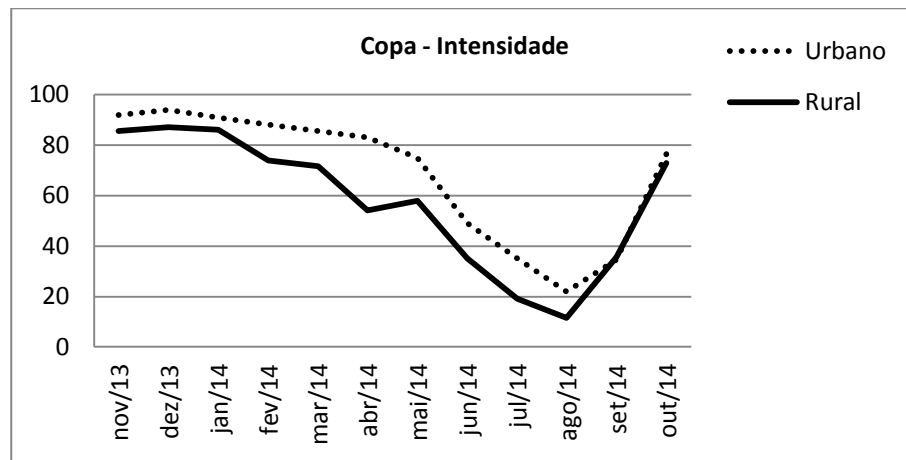


Figura 11 - Índice de intensidade para copa de *Handroanthus serratifolius* para as populações urbana e rural

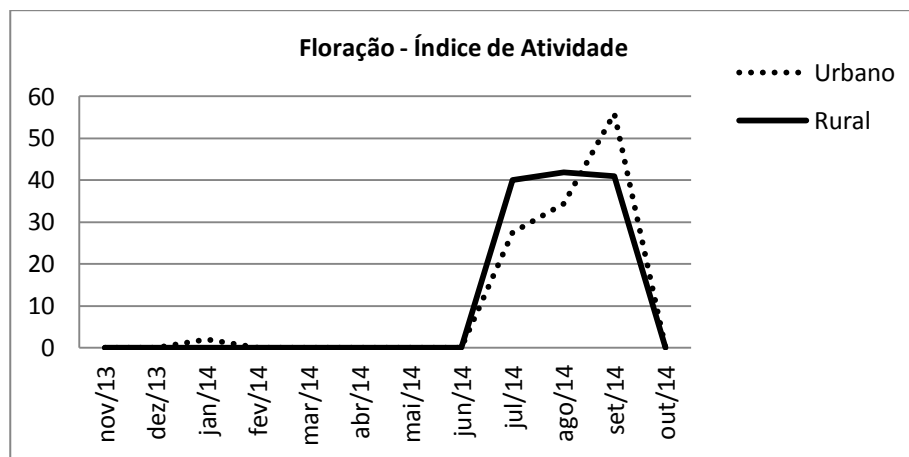


Figura 12 - Índice de atividade para floração de *Handroanthus serratifolius* para as populações urbana e rural

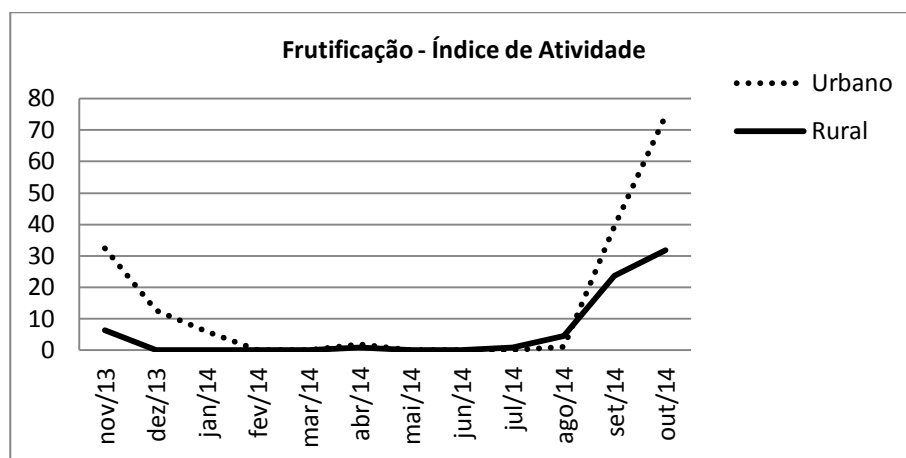


Figura 13 - Índice de atividade para frutificação de *Handroanthus serratifolius* para as populações urbana e rural

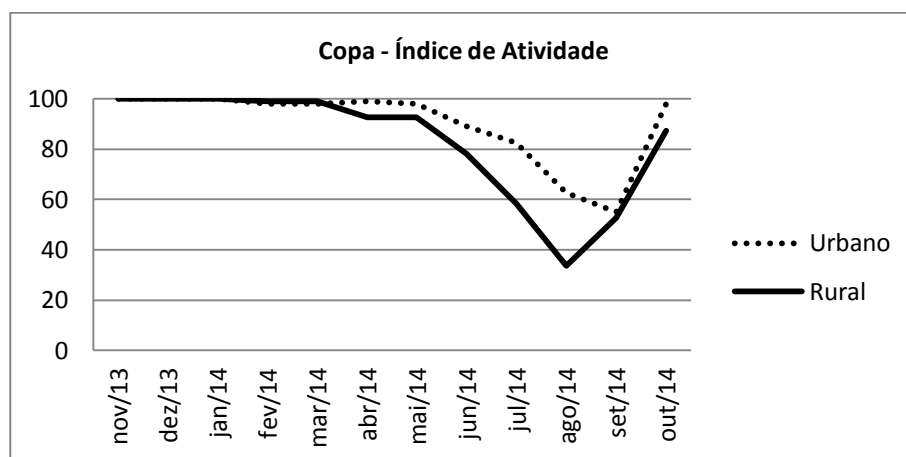


Figura 14 - Índice de atividade para copa de *Handroanthus serratifolius* para as populações urbana e rural

Como era esperado para a espécie, os eventos fenológicos entre as populações apresentaram sincronia em sua ocorrência e diversos trabalhos em florestas tropicais demonstram que os eventos fenológicos, em sua grande

maioria, são sazonais, principalmente quando as florestas estão sujeitas a uma forte estacionalidade climática (LOCATELLI; MACHADO, 2004).

Nas Figuras 15 e 16 pode-se observar que existe uma relação entre o aumento de precipitação e aumento de copa, assim como a diminuição da precipitação e floração. Elliot et al. (2006) afirmam que a queda foliar ocorre como consequência do aumento da deficiência hídrica e pelo próprio envelhecimento das folhas; a temperatura e umidade relativa do ar não apresentaram grandes variações em relação à queda foliar.

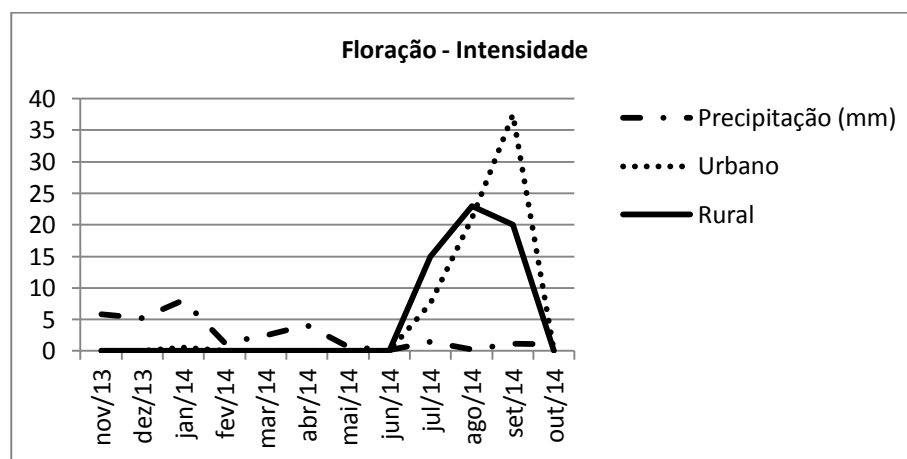


Figura 15 - Relação entre precipitação e floração para áreas urbana e rural de indivíduos de *Handroanthus serratifolius*

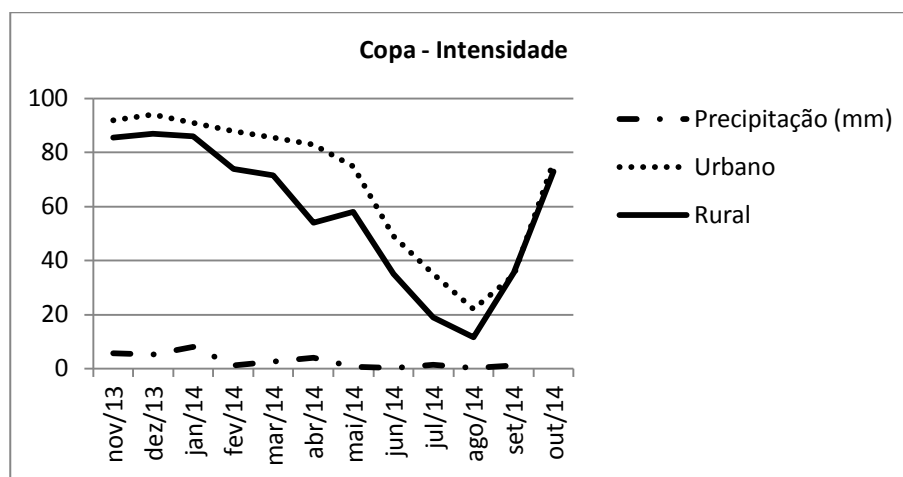


Figura 16 - Relação entre precipitação e copa para áreas urbana e rural *Handroanthus serratifolius*

As fenofases se correlacionaram significativamente com as variáveis de precipitação e umidade relativa do ar, em relação ao índice de atividade e de intensidade.

Para a fenofase frutificação, os indivíduos da população rural apresentaram correlação negativa em relação à umidade relativa do ar, para os índices de atividade e intensidade e não apresentaram correlação com a precipitação. Os indivíduos da população urbana não apresentaram correlação com as variáveis precipitação e umidade relativa do ar, em ambos os índices (Tabela 2).

Tabela 2 Correlação de Spearman entre os índices de atividade e intensidade para fenofase frutificação de *Handroanthus serratifolius* com as variáveis climáticas precipitação e umidade relativa do ar no período de novembro/13 a outubro/14

Fenofase	Avaliação	Variável climática	n	t	(p)	rs
Frutificação (Urbano)	Atividade	Precipitação	24	1.239	0.2283	0.2554
	Intensidade	Precipitação	24	1.239	0.2283	0.2554
	Atividade	Umid. Relat.	24	-0.419	0.6792	-0.089
	Intensidade	Umid. Relat.	24	-0.419	0.6792	-0.089
Frutificação (Rural)	Atividade	Precipitação	24	-0.2295	0.8206	-0.0489
	Intensidade	Precipitação	24	-0.2295	0.8206	-0.0489
	Atividade	Umid. Relat.	24	-2.6089	0.016*	-0.4861
	Intensidade	Umid. Relat.	24	-2.6089	0.016*	-0.4861

* Valores significativos

A fenofase copa apresentou correlação positiva para as variáveis climáticas umidade relativa do ar e precipitação, para as populações urbana e rural (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação de Spearman entre os índices de atividade e intensidade para fenofase copa de *Handroanthus serratifolius* com as variáveis climáticas precipitação e umidade relativa do ar no período de novembro/13 a outubro/14.

Fenofase	Avaliação	Variável climática	n	t	(p)	rs
Copa (Urbano)	Atividade	Precipitação	24	3.407	0.0025*	0.5877
	Intensidade	Precipitação	24	3.407	0.0025*	0.5877
	Atividade	Umid. Relat.	24	2.4018	0.0251*	0.4558
	Intensidade	Umid. Relat.	24	2.4018	0.0251*	0.4558
Copa (Rural)	Atividade	Precipitação	24	2.9146	0.008*	0.5278
	Intensidade	Precipitação	24	2.9146	0.008*	0.5278
	Atividade	Umid. Relat.	24	2.2583	0.0341*	0.4338
	Intensidade	Umid. Relat.	24	2.2583	0.0341*	0.4338

* Valores significativos

A fenofase floração apresentou correlação negativa para umidade relativa do ar, para os indivíduos da população urbana nos índices de atividade e intensidade e não apresentou correlação para precipitação para população urbana e os indivíduos da população rural não apresentaram correlação (Tabela 4).

Tabela 4 - Correlação de Spearman entre os índices de atividade e intensidade para fenofase floração de *Handroanthus serratifolius* com as variáveis climáticas precipitação e umidade relativa do ar no período de novembro/13 a outubro/14.

Fenofase	Avaliação	Variável climática	n	t	(p)	rs
Floração (Urbano)	Atividade	Precipitação	24	-1.5079	0.1457	-0.3061
	Intensidade	Precipitação	24	-1.5079	0.1457	-0.3061
	Atividade	Umid. Relat.	24	-2.5450	0.0184*	-0.4769
	Intensidade	Umid. Relat.	24	-2.545	0.0184*	-0.4769
Floração (Rural)	Atividade	Precipitação	24	-1.1704	0.2543	-0.2421
	Intensidade	Precipitação	24	-1.1704	0.2543	-0.2421
	Atividade	Umid. Relat.	24	-1.7134	0.1006	-0.3431
	Intensidade	Umid. Relat.	24	-1.7134	0.1006	-0.3431

* Valores significativos

A análise circular mostrou assim como os índices de atividade e de intensidade uma forte sincronia entre os eventos entre as duas populações, onde a seta indica a data média de ocorrência do evento e o comprimento da seta representa a concentração da fenofase, em relação à data média.

Para a fenofase floração, o período da data média de ocorrência da fenofase foi 1º de setembro para indivíduos da população urbana (Figura 17) e 22 de agosto, para a população rural (Figura 18). Os valores de (z) indicam a força de concentração do evento no período, em que para população urbana (z=100.37) e rural (z=116.9). Este dado também pode ser observado pelo comprimento da seta (Figuras 17 e 18), os valores de (p) indicam se a sazonalidade para ambas foi significativa, onde (p<0.001), (Tabela 5).

Na fenofase frutificação, a data média de ocorrência dos eventos foi 23 de outubro, para população urbana (Figura 19) e 7 de outubro, para indivíduos da população rural (Figura 20). Os valores indicativos de sazonalidade foram significativos para as populações com ($p < 0.0001$), (Tabela 5). A intensidade de concentração do evento foi mais alta para população urbana ($z = 131.09$), do que para população rural ($z = 59.71$), (Figuras 19 e 20), indicando que, no período, os indivíduos da população urbana apresentaram maior frutificação.

Para a fenofase copa, os valores de sazonalidade foram ($p = 0.033$) para a população urbana e ($p < 0.0001$) para a população rural (Tabela 5). A data média de ocorrência dos eventos foi 21 de fevereiro e 15 de fevereiro, respectivamente. A força de concentração do evento foi ($z = 8.63$) e ($z = 59.71$) para população urbana e rural (Figuras 21 e 22). Esta força não foi tão forte, porém ela indica que existe um período de maior probabilidade de ocorrência (Tabela 5).

Tabela 5 - Análises estatísticas circular dos eventos fenológicos de *Handroanthus serratifolius*, referentes aos eventos no período de nov/13 a out/14, com valores de probabilidade (p) com intervalo de confiança de 95%

Fenofase	N° observações	Data Média	Sazonalidade	Sincronia (z)
Floração (Urbana)	122	01/set	$p < 0.0001$	100.37
Floração (Rural)	135	22/ago	$p < 0.0001$	116.89
Frutificação (Urbana)	158	23/out	$p < 0.0001$	131.09
Frutificação (Rural)	75	07/out	$p < 0.0001$	59.71
Copa (Urbana)	1102	21/fev	$p = 0.033$	8.64
Copa (Rural)	1091	15/fev	$p < 0.0001$	28.29

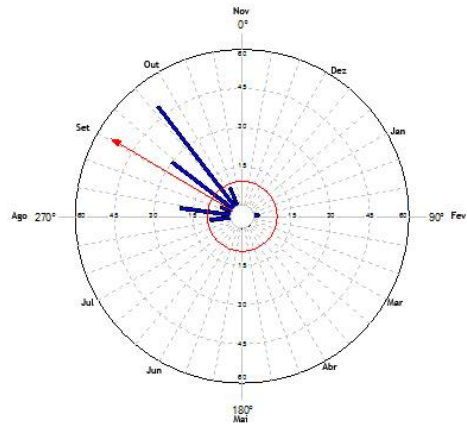


Figura 17 Histograma circular de floração para população urbana de *Handroanthus serratifolius*

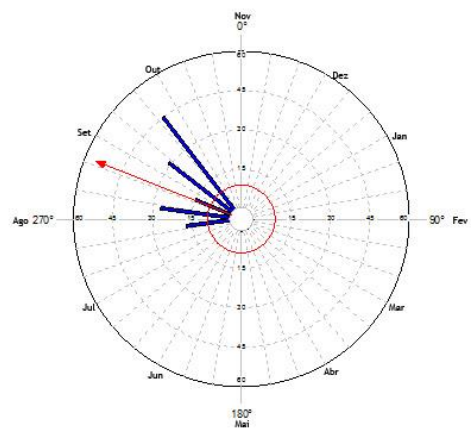


Figura 18 Histograma circular de floração para população rural de *Handroanthus serratifolius*

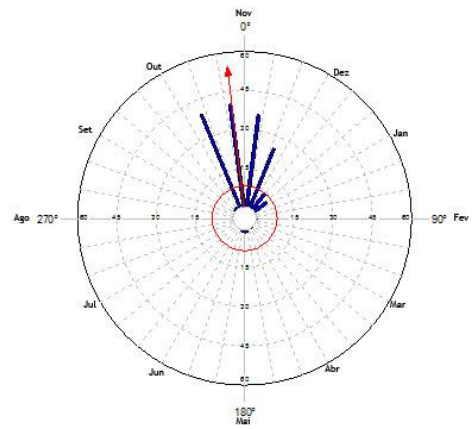


Figura 19 Histograma circular de frutificação para população urbana de *Handroanthus serratifolius*

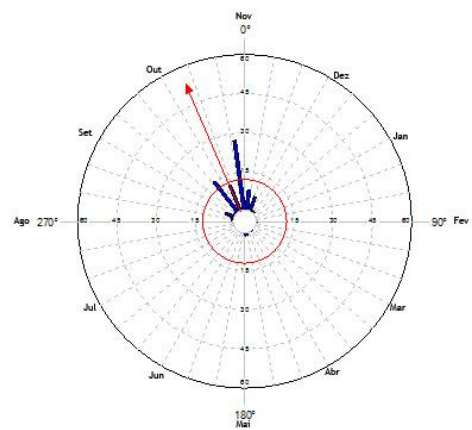


Figura 20 Histograma circular de frutificação para população rural de *Handroanthus serratifolius*

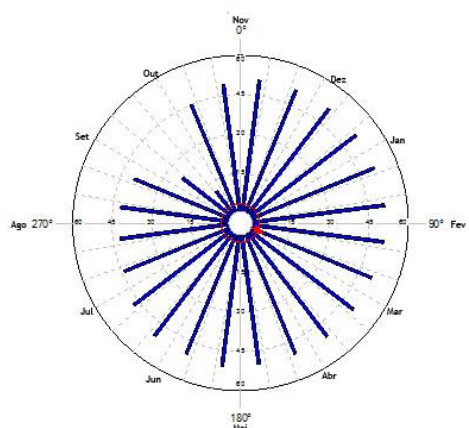


Figura 21 Histograma circular de copa para população urbana de *Handroanthus serratifolius*

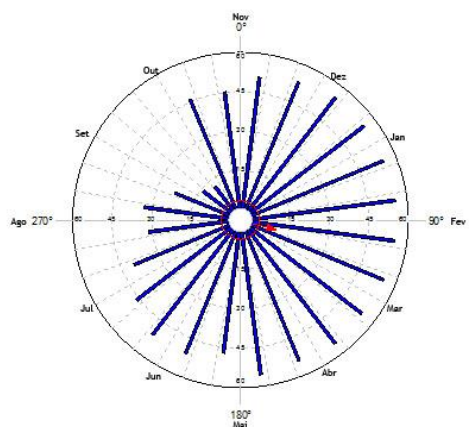


Figura 22 Histograma circular de copa para população rural de *Handroanthus serratifolius*

A maior intensidade na ocorrência dos eventos fenológicos na população urbana pode estar relacionada às ilhas de calor urbano que é o nome dado ao fenômeno no qual determinadas regiões da cidade ficam mais quentes

do que as de entorno (MONTEIRO, 1976; OKE, 1978; LOMBARDO, 1985 ; LEAL; BIONDI; BATISTA, 2014).

A maior causa para o desenvolvimento das ilhas de calor urbano é a substituição de ambientes naturais por áreas com edificações e sem permeabilidade (LANSBERG, 1981; MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). A poluição do ar, emissão de calor por edificações, tráfego e metabolismo de organismos vivos são também causas das ilhas de calor urbano.

Estudos em regiões temperadas indicam uma clara relação entre ilhas de calor e fenologia, sendo que o aumento da temperatura aparece como a principal variável climática influenciadora no desencadeamento das fenofases (ROETZER et al., 2000; MIMET et al., 2009). No entanto, estudos como estes são raros em regiões tropicais.

Entre as causas consideradas imediatas, as variações climáticas locais podem influenciar e regular os eventos fenológicos de acordo com sua intensidade e frequência (FERRAZ et al., 1999), justificando assim alterações nas fenofases das populações.

4.4 Diversidade Genética

A Tabela 6 apresenta os valores de diversidade genética para as populações de *H. serratifolius* em área urbana e rural.

Tabela 6 Estimativas genéticas das populações urbana e rural de *Handroanthus serratifolius*. Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; I: índice de Shannon; He: diversidade genética de Nei; P: porcentagem de locos polimórficos.

População	Na	Ne	He	I	P (%)
Urbana	2,0	1,67	0,38	0,56	96
Rural	2,0	1,73	0,40	0,59	96

O número de alelos observados (N_a) não apresentou variação entre as populações analisadas e o número de alelos efetivos (N_e) apresentou uma pequena variação. Nos indivíduos da população urbana, a diversidade genética (He) foi de 0,38 e o índice de Shannon (I) foi de 0,56. Nos indivíduos da área rural, a diversidade genética (He) foi de 0,40 e o índice de Shannon (I) foi de 0,59. De modo geral, os valores de diversidade genética observados em ambas as populações são um indicativo de moderada diversidade genética, comparado aos trabalhos de Silva (2010) com *Tabebuia aurea* (He = 0,294), Braga et al. (2007) também com Mori et al. (2012) com valor de He de 0,222 em *Handroanthus heptaphyllus*. Esses moderados valores de diversidade genética podem indicar a presença de endogamia, que, a longo prazo, pode levar as populações a um aumento excessivo no parentesco dos seus indivíduos, acarretando fortes prejuízos às populações de espécies florestais (YOUNG; BOYLE, 2001), causando a redução na heterozigosidade, que gera, assim, a perda do vigor reprodutivo da população. No entanto, a grande consequência prática da endogamia é que os homozigotos para alelos deletérios tornam-se, mais frequentes em populações que se reproduzem ao acaso (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

4.5 Estrutura Genética das Populações

Na Tabela 7 são apresentados os resultados da AMOVA (análise da variância molecular) para as populações urbana e rural de *Handroanthus serratifolius*. Conforme a AMOVA, pode se verificar a existência de uma maior variabilidade genética dentro das populações (93,6) do que entre elas (6,4). O índice de fixação do alelo presente apresenta valor de (0,07), o que indica pouca estruturação das populações e alta troca de alelos entre as populações.

Tabela 7 AMOVA em duas populações de *Handroanthus serratifolius*. GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados dos desvios; FST: índice de fixação.

Fonte de Variação	GL	SQ	Componentes da Variância	Varição Total (%)	FST
Entre populações	1	74.552	1,20569	6,74	
Dentro de populações	94	1567.812	16,67886	93,26	0,07
Total	95	1642.364	17.88455		

De acordo com Yun et al. (1998) é esperado que exista uma maior variabilidade genética dentro das populações de espécies arbóreas, conforme foi observado para as populações estudadas. Alguns trabalhos que confirmaram esta hipótese foram os de Fernandes (2008), com *Caryocar brasiliense* (89,97%), Meloni et al. (2006), com *Juniperus phoenicea* (76,5%), Santos; Cabral e Costa (2014), com *Handroanthus avellanidae*, Bertoni et al. (2007), com *Zeyheria Montana* (84,03%). As espécies arbóreas apresentam sistema misto de reprodução e mecanismos eficientes de dispersão de pólen e de sementes, que resultam em fluxo alélico a longa distância, diminuindo a divergência genética entre as populações e aumentando a variabilidade encontrada (LOVELESS; HAMRICK, 1984). A variabilidade genética dentro e entre as populações é um

reflexo da interação de diferentes processos como distribuição geográfica, fragmentação e isolamento das populações, sistema reprodutivo, mutação, deriva, fluxo gênico entre outros (NYBOM; BARTISH, 2000).

4.6 Estrutura Genética Espacial

A distribuição espacial dos genótipos dentro de cada população foi obtida através do coeficiente de Kinship de coancestria (HARDY, 2003) entre indivíduos para cada classe de distância (Figuras 23 e 24).

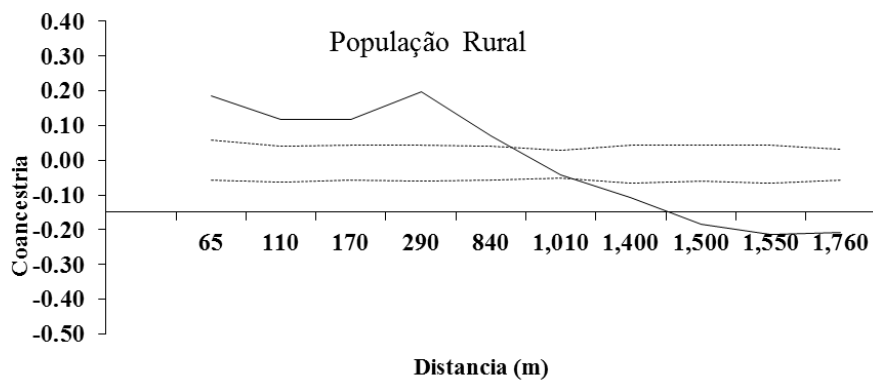


Figura 23 Correlograma de coancestria para indivíduos de *Handroanthus serratifolius* na população rural

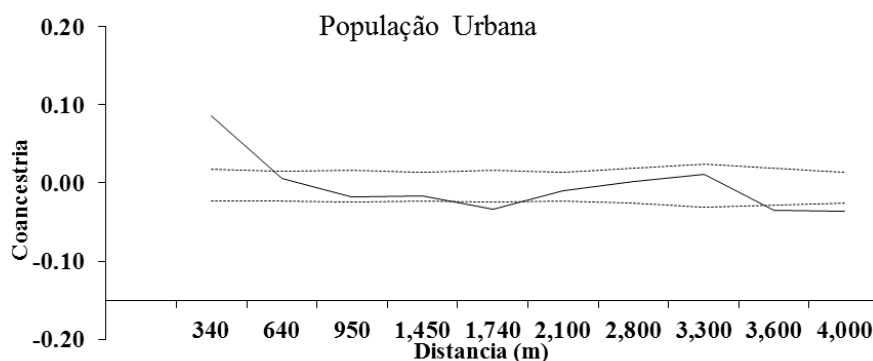


Figura 24 Correlograma de coancestria para indivíduos de *Handroanthus serratifolius* na população urbana.

Para ambas as populações foi constatada uma estruturação espacial com valores significativos de coancestria, onde o valor de significância ($p > 0,05$), indicando uma estruturação familiar para os indivíduos da população rural abaixo de 900m de distância, já para os indivíduos da população urbana essa estruturação se deu abaixo de 600m de distância.

Como observado na Tabela 8, a população rural apresenta ($p=0,822$), indicando uma estruturação espacial maior se comparada à população urbana onde ($p=0,499$).

Para a população urbana ($S_p=0,209$) e população rural ($S_p=0,029$), a população urbana apresentou valor mais elevado no valor de S_p , o que indica uma estruturação genética mais forte em finas escalas espaciais. Vekemans e Hardy (2004) realizaram um estudo de revisão onde eles encontram diferenças significativas na estatística S_p correspondente ao sistema de criação e forma de vida, mas não para os mecanismos de pólen ou dispersão de sementes, o que pode justificar a diferença para as duas populações.

O conhecimento da estrutura genética populacional é importante para evitar perdas adicionais de diversidade genética em populações que são

ameaçadas por atividades madeireiras, desmatamento e fragmentação de hábitat (HALL et al. 1994, ROCHA; LOBO, 1998), quando se pensa em conservação *in situ*, tendo em vista a preservação da população.

Tabela 8 Caracterização da estrutura espacial de *Handroanthus serratifolius*. F_{ij} : coeficiente de Kinship para primeira classe de distância; B_{log} : inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria; S_p : estatística usada para o cálculo da magnitude da estrutura genética espacial; P: valor de significância

População	F_{ij}	B_{log}	S_p	P
Urbana	0,507	-0,103	0,209	0,499
Rural	0,128	-0,025	0,029	0,822

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a efetivação de programas de conservação de espécies arbóreas é importante o conhecimento prévio de sua diversidade genética, também de como seus alelos estão distribuídos dentro da população e como se constitui a distribuição espacial dos seus genótipos. Assim se poderá atuar de maneira mais eficiente nas ações de conservação. Também se faz importante o conhecimento fenológico para que se construa melhor compreensão sobre como as questões ambientais vão interferir na maneira como a população vai se estabelecer ou permanecer.

Os dados obtidos nesse estudo apontam que, para a espécie *Handroanthus serratifolius* há uma menor diversidade genética em área urbana, o que possivelmente pode afetar as próximas gerações destas árvores que poderão estar comprometidas devido à presença da estruturação genética. Entretanto, os estudos são preliminares e investigações na próxima geração devem ser realizadas para verificar a dinâmica genética dos indivíduos amostrados em áreas urbana e rural.

Os dados dos eventos fenológicos mostraram que os indivíduos localizados na área urbana apresentam uma maior intensidade das fenofases avaliadas, comparados aos indivíduos amostrados em área rural. Entretanto, é importante a realização das avaliações das fenofases por um período maior, para verificar suas variações, em uma escala temporal. Somente assim se poderá ter um quadro dos eventos fenológicos em ambientes distintos e a certeza que as alterações na intensidade das atividades são devidas às alterações climáticas.

A correlação de dados genéticos e fenológicos é difícil de ser evidenciada, pela natureza peculiar de suas análises. Entretanto, estudos dessa natureza estão sendo realizados e espera-se que a junção desses dados possam nortear programas de conservação genética de espécies arbóreas.

Estudos de características genéticas e ecológicas para a preservação de *Handroanthus serratifolius* são necessários e importantes, pois, a espécie não está imune a eventos externos desfavoráveis e alterações climáticas drásticas.

6 CONCLUSÕES

As populações de *H. serratifolius* apresentaram moderados níveis de diversidade genética tanto em área urbana ($He=0,38$), como em rural ($He=0,40$).

A estrutura genética espacial mostrou valores significativos de coancestria, ou seja, existe uma estruturação familiar entre as populações a distâncias de 600 e 900 m nas áreas urbana e rural, respectivamente.

A fenologia reprodutiva ocorreu de maneira sincrônica e sazonal entre as áreas urbana e rural, ocorrendo no final da estação seca e início da chuvosa.

A fenologia vegetativa ocorreu de maneira sincrônica e sazonal entre as áreas urbana e rural e foi influenciada pela precipitação.

Para os eventos fenológicos, observou-se que os indivíduos da população urbana apresentaram maior intensidade na ocorrência dos eventos.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, G. **Filogenia e diversidade genética do gênero *Cunila D. Royenex L.*, (Lamiaceae)**. 2008. 146 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v. 22, n. 6, p. 711-728, Jan. 2014.
- AWALE, S. et al. Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, n. 6, p.710-713, Jun. 2005.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 4.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2007. 324 p.
- BARBOSA, N. C. C. P.; DE FREITAS, S.; MORALES, A. C. Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen)(Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v.58, n. 2, p. 203-211, June 2014
- BARREIRA, S. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish com base para manejo florestal**. 2005. 73f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BENCKE, C. S. C.; MORELLATO, L. P. C. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 269-275, Sept. 2002b.
- BENCKE, C. S. C.; MORELLATO, L. P. C. Estudo comparativo da fenologia de nove espécies arbóreas em três tipos de floresta atlântica no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 237-248, June 2002a.
- BERTONI, B. W. et al. Genetic variability in natural populations of *Zeyheria montanamarit.* From the Brazilian Cerrado. **Science Agrícola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 409-415, July/Aug. 2007.

BRAGA, A. C. et al. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.7, n. 1, p. 53-56, Jan. 2007.

BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35. n. 5. p. 957-964, 2011.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 52, n. 4, p. 145-157, July 1978.

CAMACHO, M.; OROZCO, L. Patrones fenológicos de doce espécies arbóreas Del bosque montano de La Cordillera de Talamanca, Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, Costa Rica, v. 46, n. 3, p. 533-542, set. 1998.

CHENNA, P. H. et al. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of Mono (arylimino) Derivatives of α -Lapachone. **Journal Medical Chemistry**, Bethesda, v. 44, n. 15, p. 2486-2489, July 2001.

CONCEIÇÃO, A. A.; FUNCH, L. S.; PIRANI, J. R. Reproductive phenology pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the “Chapada Diamantina” northeastern Brazil: population and community analyses. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 475- 485, July/Sept. 2007

DAWSON, I. K. et al. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. **Heredity**, Sheffield, v. 74, n. 1, p. 10-18, Jan. 1995.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, San Francisco, n. 12, n. 1, p. 13-15, Nov. 1990.

ELLIOTT, S.; BAKER, P. J.; BORCHERT, R. Leaf flushing during the dryseason: the paradox of Asian monsoon forests. **Global Ecology. Biogeography**, Hoboken, n. 15, n. 3, p. 248–257, May 2006.

ELZINGA, J. A. et al. Time after time: flowering phenology and biotic interactions. **Trends in Ecology & Evolution**, n. 22, n. 8, p. 432-439, Aug. 2007.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin**: a software for population data analysis. Version 3.5. Geneva: University of Geneva, 2007. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 131, p. 479-491, June 1992.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 3, p. 408-417, 1997.

FARJADO, C. G.; VIEIRA, F. D.; MOLINA, W. F. Interspecific genetic analysis of orchids in Brazil using molecular markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n.8, p. 1825-1832, Oct. 2014.

FERNANDES, R. C. **Diversidade e Estrutura Genética em populações naturais do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb) no norte de Minas Gerais**. 2008. 73p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

FERRAZ, D. K. et al. Fenologia de árvores em fragmento de mata em São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 59, n. 2, p. 305-317, 1999.

FISHER, N. I. **Statistical analysis of circular data**. Cambridge: University Press, 1993. 277p.

FOURNIER, L. A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba**, San José, v. 24, p. 422-423, 1974.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.

FUTUYAMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631 p.

GE, X.; SUN, M. Population genetic structure of *Cerriopstagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. **Wetlands Ecology and Management**, Dordrecht, v. 9, n. 3, p. 203-209, June 2001.

GROSS, C. L. A. A comparison of the sexual systems in the trees from the Australian tropics with other tropical biomes – more monoecy but why? **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, n. 6, p. 907-919, June 2005.

HALL, P.; ORRELL, L.C.; BAWA, K.S. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapaguianensis* (Meliaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, n. 81, p. 1104-1111, Sept. 1994.

HAMRICK, J. L. Plant populations genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M. et al. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park: Benjamins Cummings Publishing Company, 1983. p. 335- 348.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. T. Allozyme diversity in plant species. In: BROW, A. H. D. et al. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1990. p. 43-63.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. T. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. (Ed.). **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. p. 281-304.

HARDY, O. J. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation by distance processes using dominant genetic markers. **Molecular Ecology**, Hoboken, n. 12, n. 6, p. 1577–1588, June 2003.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGEDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2. p. 618-620, Dec. 2002.

HOLDEREGGER R.; KAMM U.; GUGERLI F. Adaptive versus neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. **Landscape Ecology**, n. 21, p. 797–807, 2006.

HOLSINGER, K. E.; LEWIS, P. O.; DEY, D. K. A bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 11, n. 7, p. 1157-1164, July 2002.

JUSTINIANO, M. J.; FREDERICKSEN, T. S. Phenology of tree species in Bolivia dry forest. **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 2, p. 276-281, June 2000.

KIMURA, M.; CROW, J. F. Number of alleles that can be maintained in finite population. **Genetics**, Bethesda, v.49, p.725-738, Apr. 1964.

KOVACH W. L. Oriana for Windows. Versão 4.0 Pentraeth, Wales, UK: Kovach Computer Services, 2013.

LEAL, L.; BIONDI, D.; BATISTA, A. C. Condições meteorológicas e diferenças térmicas diárias extremas na cidade de Curitiba. **Scientia Plena**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 1-11, jan. 2014.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, v. 6, p. 381-398, 1972.

LIETH, H. (Ed.). Purpose of a phenology book. In: _____. **Phenology and seasonality modeling**. New York: Springer Verlag, 1974. Part 1, p. 3-19. (Ecological Studies, 8).

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system ctoton. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 205-208, Sept. 2001.

LOCATELLI, E. M.; MACHADO, I. C. Fenologia de espécies arbóreas de uma Mata Serrana (Brejo de Altitude) em Pernambuco, Nordeste do Brasil. In: PORTO, K. C.; CABRAL, J. J.; TABARELLI, M. (Org.). **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. v. 1. p. 255-276.

LOHMANN, L. G. Bignoniaceae in lista de espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB117466>>. Acesso em: 09 jan. 2015.

LOMBARDO, M. A. **Ilha de calor nas metrópoles: o exemplo de São Paulo**. São Paulo: Hucitec, 1985.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, 1992. 367p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J.L. (Ed.). **Conservation genetics**: case histories from nature. New York: Chapman & Hall, 1984. p. 281-304.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review Of Ecology And Systematics**, v. 15, p. 65-95, Nov. 1984.

MACHADO, I. C. S.; LOPES, A. V. Floral traits and pollination systems in the caatinga, a Brazilian tropical dry forest. **Annals of Botany**, London, v. 94, n. 3, p. 365-376, Mar. 2004.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "in situ". **Revista do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, v. 35, n. 2, p. 71-78, abr. 1987.

MELONI, M. et al. Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Annals of Botany**, London, v. 97, n. 2, p. 299-304, Feb. 2006.

MENDONÇA, F. A.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. **Climatologia**: noções básicas e climas do Brasil. São Paulo: Oficina do Texto, 2006. 206 p.

MIMET, A. et al. Urbanisation induces early flowering: evidence from *Platanus acerifolia* and *Prunus cerasus*. **International Journal of Biometeorology**, v. 53, n. 3, p. 287-298, Mar. 2009.

MONTEIRO, C. A. F. **Teoria e Clima Urbano**. São Paulo: IGEO/USP, 1976. (Série Teses e Monografias, 25).

MORELLATO, L. P. C. Fenologia e suas aplicações no estudo e monitoramento de mudanças climáticas. In: REGO, G. M.; NEGRELLE, R. B.; MORELLATO, L. P. C. (Org.). Fenologia como ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais. Colombo: Embrapa, 2007. p. 203-212.

MORELLATO, L. P. C. et al. Phenology of Atlantic rain forest trees: a comparative study. **Biotropica**, Hoboken, v. 32, n. 4b, p. 811-823, Dec. 2000.

MORELLATO, L. P. C. et al. The influence of sampling method, sample size and frequency observations on plant phenological patterns and interpretation in tropical forest trees. In: HUDSON, I. L.; KEATLEY, M. (Ed.). **Phenological research: methods for environmental and climate change analysis**. Dordrecht: Springer, 2010. p. 99-121.

MORELLATO, L. P. C.; LEITÃO FILHO, H. F. Estratégias fenológicas de espécies arbóreas em floresta de altitude na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 50, n. 1, p. 149-62, 1990.

MORI, N. T. et al. Genetic diversity between and within populations of *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos using microsatellite markers. **Cerne**, Lavras, v. 8, n.1, p. 9-15, Jan./Mar. 2012.

NARZARY, D.; RANA, T. S.; RANADE, S. A.. Genetic diversity in inter-simple sequence repeat profiles across natural populations of Indian pomegranate (*Punicagranatum* L.) **Plant Biology**, Bethesda, v. 12, n. 5, p. 806-813, Sept. 2010.

NASCIMENTO, M. A. et al. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 394-397, June 2010.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

NEWSTRON, L. E. et al. Diversity of long-term flowering patterns. In: McDade, L. A. et al. (Ed.). **La Selva: ecology and natural history of a neotropical rain forest**. Chicago: Chicago University Press, 1994. p. 142-160.

NYBON, H. Comparison of different nuclear DNA markers forestimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Hoboken, v.13, n. 5, p.1143– 1155, May 2004.

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. 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**, Munchen, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

OLIVEIRA, L. M. de et al. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley (Bignoniaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 2, p. 138-143, Dec. 2004.

OLIVEIRA, P. E. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies de cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Ed.). **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa, 2008. p. 273-287.

OLMSTEAD, R. G.; GROSSE, S. O. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* S.1. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, Kent, v. 32, p. 660-670, 2007.

OKE, T. R. Boundary layer climates. 2nd. ed. London: Methuen, 1978.

PARK, B. S. et al. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 4, p. 1152-1157, Feb. 2005

PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Munchen, v. 76, n. 1, p. 93-98, June 2001.

QIAN, W.; GE, S.; HONG, D. Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryzagranelata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 102, n. 2-3, p. 440-449, Feb. 2001.

RATHCKE, B.; LACEY, E. P. Phenological patterns of terrestrial plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 179-214, 1985.

ROCHA-NUNEZ, O. J. et al. Genetic diversity and outcrossing rates in the guana caste tree (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq.) in the dry forests of Costa Rica. In: WORKSHOP: recent advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management. **Proceedings...** Florianopolis: Stockholm International Foundation for Science (IFS), 1998. p. 65-81.

RODRIGUES, R. R.; MARTINS, S. V.; BARROS, L. C. Tropical Rain Forest regeneration in an area degraded by mining in Mato Grosso State, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.190, n. 2-3, p. 323-333, Mar. 2004.

ROETZER, T. et al. Phenology in central Europe: difference and trends of spring phenophases in urban and rural areas. **International Journal of Biometeorology**, n. 44, p. 60–66, 2000.

ROLDAN-RUIZ, I. et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, . 6, p. 125-134, 2000.

SANTOS, L. S.; CABRAL, G. P.; COSTA, R. R. G. F. Variabilidade genética entre e dentro de progênies de ipê rosa (*Han-droanthus avellanadae* (Lorentz ex Griseb.) Mattos (Bignoniaceae). **Global Scienc and Technology**, Rio Verde, v. 7, n. 2, p. 98–105, maio/ago. 2014.

SILVA, C. A. et al. Reproductive success and genetic diversity of *Psychotria hastisepala* (rubiaceae), in fragmented Atlantic forest, Southeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 62, n. 1, p. 309-319, 2014.

SILVA, M. C. **Diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética espacial e fluxo gênico em *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f.ex S. Moore no cerrado**. 2010. 162 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

SOULÉ, M. **Conservationbiology**. Cambridge: Sinauer, 1986. 104 p.

SOUZA, V. Q. et al. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 569-575, 2005.

SU, Y.; WANG, T.; OUYANG, P. High genetic differentiation and variation as revealed by ISSR marker in *Pseudotsuschienii* (Taxaceae), an old rare conifer endemic to China. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 579-588, 2009.

TALORA, D. C.; MORELLATO, L. P. C. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 23, p. 13-26, 2000.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Izoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1995. 186 p.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v.13, p. 921-935, 2004.

VIDAL-TESSIER, A. M. Sur de quíñónez lipophiles du bois de tronc de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 46, n. 1, p. 55-57, 1988.

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 17, n. 10, p. 2305-2321, 2008.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetica data**. Durham: Sunderland, 1990. 337 p.

WHITE, M. A. et al. Satellite evidence of phenological differences between urbanized and rural areas of the eastern United States deciduous broadleaf forest. **Ecosystems**, n. 5, p. 260-73, 2002.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data**, v. 395, part B, p. 134-144, 2005.

YEH, F. C. et al. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1997.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Shangai, v. 37, n. 1, p. 141-146, 1996.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics: principles and practice**. Oxford: CSIRO, 2001. p.123-134.

YUN, R. et al. Study on DNA diversity of Liaodong populations at Dongling mountain region. **Acta Botanica Sinica**, v. 40, p.169-175, 1998.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1999. 931p.

ZIETJIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.