



MURILO MALVEIRA BRANDÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E
FILOGEOGRAFIA DE *Ceiba pubiflora* (A.St.-Hil.)
K. Schum. (MALVACEAE)**

LAVRAS – MG

2012

MURILO MALVEIRA BRANDÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA DE *Ceiba pubiflora*
(A.St.-Hil.) K. Schum. (MALVACEAE)**

Tese 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 em Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

PhD. Dulcinéia de Carvalho

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Brandão, Murilo Malveira.

Diversidade genética e filogeografia de *Ceiba pubiflora* (A.St.-
Hil.) K. Schum. (Malvaceae) / Murilo Malveira Brandão. – Lavras :
UFLA, 2012.

115 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Arco Pleistocênico. 2. Conservação genética. 3. Unidades
operacionais. 4. ISSR. 5. cpDNA. 6. Populações de plantas. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 574.52642

MURILO MALVEIRA BRANDÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA DE *Ceiba pubiflora*
(A.St.-Hil.) K. Schum. (MALVACEAE)**

Tese 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 em Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 29 de junho de 2012.

Dra. Rosângela Alves Tristão Borém	UFLA
Dr. Rubens Manoel dos Santos	UFLA
Dr. Fábio de Almeida Vieira	UFRN
Dr. Afrânio Farias de Melo Júnior	UNIMONTES

PhD. Dulcinéia de Carvalho - UFLA

Orientadora

LAVRAS - MG

2012

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo!

À minha orientadora pelos ensinamentos e amizade construída nesses anos!

*À Universidade Federal de Lavras, Universidade Estadual de Montes Claros e
Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG pelo incentivo à
pesquisa com financiamento ao projeto e concessão da bolsa de estudos.*

DEDICO

RESUMO GERAL

As Florestas Estacionais Deciduais (FEDs) sobre afloramento calcário são formações peculiares sujeitas à degradação pela retirada de madeira e exploração de calcário, para produção de cimento. Algumas dessas florestas representam os últimos remanescentes de cobertura vegetal nativa, funcionando como ilhas de vegetação. Segundo a teoria do Arco Pleistocênico, as FEDs provavelmente resultam de origem vicariante, após isolamento provocado pelo recuo das Florestas Secas e avanço do Cerrado no Brasil Central. As espécies arbóreas que se estabelecem nesses remanescentes carecem de informações relativas à ecologia e à genética. A espécie arbórea *Ceiba pubiflora* (Malvaceae) possui uma ocorrência comum nos afloramentos calcários no Brasil. Objetivou-se neste trabalho verificar a diversidade genética em populações naturais de *C. pubiflora*, testar *primers* cpDNA, para realização de inferências históricas filogeográficas, indicar áreas que possam ser centros de diversidade da espécie e aquelas que possam funcionar como Unidades Operacionais de conservação. Marcadores ISSR (95 locos) e cpDNA (regiões EF e CS3) foram utilizados para estimar os índices de diversidade genética e inferências históricas filogeográficas em populações naturais de *C. pubiflora* amostradas no domínio da Caatinga (6 populações), Cerrado (3 populações) e Atlântico (4 populações). A espécie apresentou alta diversidade genética ($H_T=0,345$; $P_{LP}=97,8\%$), com maior parte da variabilidade genética ocorrendo dentro das populações (91,5%). As populações de Santo Hipólito, Januária e Montalvânia apresentaram maiores índices de diversidade genética. A população de Santo Hipólito foi a que mais contribuiu para o fluxo gênico, revelados pelos marcadores ISSR. Essas populações devem ser priorizadas para conservação. As bacias do rio Paranã (Goiás) e rio São Francisco na Caatinga Arbórea (norte de Minas Gerais e Bahia) conservam maior diversidade de haplótipos, sendo prioritárias para conservação. Essas regiões apresentam haplótipos comuns com o grupo Centro-Sul de Minas Gerais, indicio que essas populações foram interligadas no passado. Unidades Operacionais podem ser criadas (1) na região sul de Minas Gerais, (2) na região central de MG, (3) no norte de MG e sul da Bahia e (4) no Planalto Central, em Goiás. Os resultados apóiam a hipótese do Arco Pleistocênico.

Palavras-chave: ISSR, cpDNA, Arco Pleistocênico, Conservação Genética, Unidades Operacionais.

ABSTRACT

The Seasonal Dry Tropical Forests (SDTFs) on limestone outcrops are features peculiar subject to degradation by logging timber and exploitation of limestone for cement production. Some of these forests represent the last remnants of native vegetation cover, operating as islands. Tree species that are established in these remaining needs of information on genetic and ecology aspect. The tree species *Ceiba pubiflora* (Malvaceae) commonly occurs on limestone outcrops in central region of Brazil. The flowers of this species are pollinated by hummingbirds and seed dispersal anemochoric. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity in natural populations of *C. pubiflora* located in central Brazil, selection of cpDNA primers for historical phylogeographic inferences and indicate areas that may be centers of diversity of species and indicate those that can function as operational units for conservation. ISSR and cpDNA markers were used to estimate the levels of genetic diversity and historical phylogeographic inferences in natural populations of *C. pubiflora* sampled in the area of Caatinga, Cerrado and Atlantic domain. The species had high genetic diversity, with most occurring genetic variability within populations. The basins of the Parana River (Goiás) and the Sao Francisco River in Arboreal Caatinga (north of Minas Gerais and Bahia) retain greater diversity of haplotypes, and priority for conservation. Operating Units can be created (1) in the southern region of Minas Gerais, (2) in the central region of Minas Gerais (3) in the north of Minas Gerais and southern Bahia and (4) in the Central Plateau in Goiás. The results support the Pleistocene Arc hypothesis.

Keywords: ISSR, cpDNA, Pleistocene Arc, Conservation Genetic, Management Unites.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 <i>Conservação Genética de Espécies Arbóreas</i>	14
2.2 <i>Marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)</i>	17
2.3 <i>Marcadores cpDNA</i>	19
2.4 <i>Florestas Estacionais Deciduais Sobre Afloramentos Calcários</i>	22
2.5 <i>Ceiba pubiflora (A.St.-Hil.) K. Schum.</i>	24
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS	27
SEGUNDA PARTE: ARTIGOS	
Artigo I: <i>Ceiba pubiflora</i> (Malvaceae): diversidade genética em afloramentos calcários no Brasil Central	36
Resumo	36
Abstract	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 <i>Caracterização das Populações e Coleta de Material</i>	42
2.2 <i>Extração do DNA e PCR-ISSR</i>	44
2.3 <i>Análise dos Dados</i>	46
2.3.1 <i>Número de Locos Polimórficos</i>	46
2.3.2 <i>Diversidade Genética</i>	47
2.3.3 <i>Estrutura Genética</i>	48
3 RESULTADOS	52
3.1 <i>Marcadores ISSR</i>	52
3.2 <i>Diversidade Genética</i>	54
3.3 <i>Estrutura Genética</i>	58
4 DISCUSSÃO	66
5 IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO	75
REFERÊNCIAS	76

Artigo II: Seleção de <i>primers</i> cpDNA e inferências filogeográficas de <i>Ceiba pubiflora</i> (Malvaceae) em afloramentos de rochas carbonáticas.....	86
Resumo	86
Abstract	87
1 INTRODUÇÃO	88
2 MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1 <i>Amostragem e Coleta de Material</i>	92
2.2 <i>Extração do DNA e Reação PCR-cpDNA</i>	94
2.3 <i>Purificação da Reação cpDNA com Enzimas de Restrição</i>	95
2.4 <i>Reação de Preparo e Purificação para Sequenciamento</i>	95
2.5 <i>Seleção de primers cpDNA e número de haplótipos</i>	97
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
3.1 <i>Seleção de Primers cpDNA</i>	98
3.2 <i>Inferências Filogeográficas de Ceiba pubiflora</i>	101
4 IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO	107
REFERÊNCIAS	109

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As Florestas Estacionais Deciduais (FED) provavelmente representaram um remanescente contínuo no período seco do Pleistoceno, ocupando atualmente dois principais grandes centros: Caatinga (Brasil) e os Chacos (Argentina, Bolívia, Paraguai e parte do Mato Grosso do Sul). Alguns núcleos menores de FED são encontrados nos Andes da Bolívia, Peru e no Brasil central em remanescentes rochosos, principalmente de calcário (PENNINGTON; LEWIS; RATTER, 2006; WERNECK; FRANCESCHINELLI; TAMEIRÃO-NETO, 2000). Estas florestas têm merecido especial atenção por carecerem de informações sobre uma classificação fitogeográfica coerente e sobre a ecologia desses ambientes, que vem sofrendo nas últimas décadas com a degradação antrópica. Recentemente as Florestas Estacionais Deciduais estiveram em foco na mídia e discussões parlamentares sobre sua inserção ou não no Domínio da Mata Atlântica.

A floresta Amazônica e Atlântica foram, provavelmente, contínuas no passado (BIGARELLA; ANDRADE-LIMA; RIEHS, 1975). Informações palinológicas do Quaternário mostraram que, entre 33.000 e 25.000 anos atrás, a região do Brasil Central era mais úmida que hoje e coberta pela floresta tropical úmida (LEDRU, 1993) e durante a última glaciação (18.000-12.000 anos atrás), o corredor atual de vegetação xérica era coberto por extensas florestas (PRADO; GIBBS, 1993). Isso indica a predominância de vegetação arbórea sazonal durante a maioria da era Pleistocênica.

Alguns autores (PENNINGTON; PRADO; PENDRY, 2000; PRADO, 2000; PRADO; GIBBS, 1993) sugerem também que a vegetação adaptada a clima seco, Floresta Estacional Decidual, pode ter expandido amplamente durante o último período glacial. Estudos palinológicos, realizados por Ledru

(1993) indicam que talvez esta formação vegetal contínua tenha alcançado sua extensão máxima durante um período de clima seco e frio do Pleistoceno. No período atual, FEDs também estão presentes em pequenas manchas no Brasil central, principalmente sobre afloramentos calcários, onde as condições edafoclimáticas são favoráveis para sua ocorrência.

Nos últimos anos FEDs sofreram forte perturbação, principalmente pelo desmatamento para exploração de madeira e abertura de extensas áreas para pecuária, e exploração do calcário pela indústria de cimento (SANTOS et al., 2012; WERNECK; FRANCESCHINELLI; TAMEIRÃO-NETO, 2000). Essas intervenções antrópicas têm impacto sobre a ecologia e a diversidade genética das espécies que ocorrem nesses ambientes.

Estudos sobre a diversidade genética das populações naturais remanescentes são importantes para compreender padrões de dispersão atual da espécie, fluxo gênico e uma abordagem recente, denominada Genética da Paisagem, que busca associar discontinuidades genéticas com barreiras naturais ou antrópicas. A abordagem genética da paisagem é importante para indicação de áreas que possuem populações com atributos genéticos significativos, capazes de garantir a manutenção de parte da herança evolutiva (*ESU's – Evolutionary Significant Unit*), sendo apontadas tais áreas como prioritárias para conservação genética (MANEL et al., 2003).

Identificar populações que apresentam atributos genéticos, tais como padrão espacial de estrutura genética, populações geneticamente divergentes e áreas com alta diversidade genética, são importantes para a indicação das Unidades Operacionais (UO). Essas Unidades podem nortear estratégias eficientes de conservação da espécie *in situ* ou *ex situ* (DINIZ-FILHO; TELLES, 2002; MANEL et al., 2003).

Outra abordagem na genética de conservação é a Filogeografia. Estudos de Filogeografia em plantas são realizados partindo-se da análise do genoma do

cloroplasto (cpDNA). Esta molécula apresenta uma lenta taxa de evolução, o que abre caminho para estudos sobre os padrões de diferenciação genética entre populações e entre regiões. O genoma do cpDNA é matematicamente herdado, o que possibilita fazer inferências sobre padrões de dispersão históricas de sementes, rotas de recolonização e locais de refúgios da espécie (MCCAULEY, 1995; NEWTON et al., 1999). Estudo de filogeografia é importante como estratégia de conservação da espécie em longo prazo.

Para estudar a diversidade genética e filogeografia em populações remanescentes em afloramentos rochosos, é importante escolher uma espécie de comum ocorrência nessas áreas. *Ceiba pubiflora* (A.St.-Hil.) K. Schum. (Malvaceae) possui marcada presença em afloramentos de calcário, apesar de sua ocorrência ser rara. Sua distribuição vai desde o Mato Grosso Sul até a Caatinga do Norte de Minas Gerais e Bahia (OLIVEIRA-FILHO, 2006). Entre algumas características da espécie, destaca-se o tronco com intumescência, a presença de acúleos nos troncos e ramos, e as folhas compostas e digitadas. A polinização é realizada principalmente por beija-flores. O fruto é uma cápsula oblonga e deiscente, com sementes leves de dispersão anemórica (GIBBS; SEMIR, 2003).

Assim, objetiva-se neste trabalho verificar os níveis de diversidade genética contida nas populações de *Ceiba pubiflora*, de ocorrência no Brasil Central. Além disso, buscou-se identificar aquelas populações que podem funcionar como Unidades Operacionais para conservação da espécie e seleção de *primers* cpDNA para estudos de filogeografia da espécie. Buscou-se verificar as seguintes hipóteses: (1) os afloramentos calcários, que são fragmentos naturais de FEDs, conservam alta diversidade genética; (2) o padrão de distribuição dos haplótipos de cpDNA corroboram com a teoria do Arco Pleistocênico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Conservação Genética de Espécies Arbóreas

A genética da conservação abrange o manejo genético de populações naturais, objetivando a manutenção da diversidade genética, a partir da diminuição dos efeitos do endocruzamento. Neste aspecto, o foco da conservação genética de espécies arbóreas é a indicação de populações para delimitação de unidades de manejo e conservação (MANEL et al., 2003). A aplicação das técnicas moleculares na genética da conservação é uma importante ferramenta para reduzir os riscos de extinções em populações ameaçadas. É crescente o entendimento da importância dos aspectos genéticos para criação de reservas e parques florestais que preservam a máxima variabilidade genética (DUARTE, 2011; MORAES; MONTEIRO; VENCOVSKY, 1999; PÁDUA, 2011).

A utilização irracional dos recursos naturais, em especial os florestais, tem levado à diminuição do tamanho das populações e aumento do isolamento entre elas, diminuindo, ao longo do tempo, a variabilidade genética entre e dentro dessas populações (FREITAS et al., 2006). Para populações que apresentam altas taxas de endogamia e parentesco, devido à diminuição no tamanho populacional, podem ter os efeitos da endogamia reduzidos adotando práticas de manejo de reposição, como apontando por Sebbenn e Etori (2001). Essa prática deve ser adotada com ponderação, podendo ser empregada em populações que estão em vias de extinção, uma vez que a introdução de alelos selecionados para determinado tipo de ambiente pode favorecer a redução do *fitness* na população ao qual foi introduzida, levando a uma depressão exogâmica (BEGON; COLIN; HARPER, 2006).

Algumas estratégias de manejo e conservação genética de espécies arbóreas são discutidas em Moraes, Monteiro e Vencovsky (1999). Os autores ressaltam que se as árvores de uma determinada espécie que ocorrem em populações de baixa densidade, com alta taxa de endogamia, a preservação pode ser feita a partir de poucos indivíduos de cada população. Neste caso, a conservação *ex situ* da espécie pode ser priorizada. Segundo Sebbenn e Etori (2001), a variabilidade genética das populações de espécies ameaçadas de extinção pode ser mantida com medidas de conservação *ex situ*, importante para manutenção e ampliação da variabilidade genética. Todavia, se determinada espécie apresenta grande quantidade de indivíduos em suas populações (tamanho efetivo) e baixa taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados, manter poucas populações para conservação genética da espécie pode ser impróprio, uma vez que os efeitos da depressão por endogamia e deriva genética podem ser acentuados. Neste caso, é mais indicado a conservação de grandes áreas como reservas ecológicas (MORAES; MONTEIRO; VENCOVSKY, 1999).

Estudos sobre os níveis e distribuição da variabilidade genética, entre e dentro de populações de espécies arbóreas, são importantes para a definição de unidades que funcionem como aquelas capazes de manter a capacidade evolutiva da espécie (MANEL et al., 2003). Segundo Wright (1943) a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações está associada à dinâmica de movimentação dos alelos nas populações, influenciada pelo sistema reprodutivo da espécie, forma de cruzamento e síndromes de dispersão do pólen e das sementes. Neste caso, as interações com outros organismos, como por exemplo, polinizadores e dispersores de sementes, são importantes para o fluxo gênico dentro e entre as populações.

O fluxo gênico (Nm), ou fluxo alélico, proporciona a homogeneização dos alelos entre as populações (HARTL; CLARK, 1997), contribuindo para

contrapor os efeitos da deriva genética. A chegada de um migrante por geração, ou seja, a chegada de um conjunto alélico diferente, introduzido via pólen ou semente, originada de outra população, é suficiente para minimizar os efeitos do cruzamento de indivíduos aparentados (MILLS; ALLENDORF, 1996; WANG, 2004). Outros autores (SLATKIN, 1987; WRIGHT, 1951) apontam o ideal de Nm superior a 4 migrantes por geração, para minimizar os efeitos dos endocruzamentos eventuais que ocorrem dentro das populações.

A fragmentação florestal pode levar ao isolamento reprodutivo das populações. Em adição ao efeito de isolamento, que reflete no fluxo gênico entre populações, a diminuição demográfica pode causar perda de alelos devido à deriva genética, caso a dinâmica de fluxo gênico não seja restabelecida com o passar das gerações (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004). Quanto maior a diminuição do tamanho populacional, maior será a perda da variabilidade genética (SEOANE; KAGEYAMA; SEBBENN, 2000). Estudos de diversidade genética em fragmentos naturais, como as FEDs sobre afloramento calcário, são escassos.

Neste cenário, a conservação genética de espécies arbóreas, mesmo em populações que não apresentem diminuição da variabilidade genética, é fundamental para gerações futuras, uma vez que seu potencial evolutivo deve ser preservado, frente às condições climático-ambientais em constante mudança (FREITAS et al., 2006). Assim, pesquisas sobre genética de populações naturais de florestas, nas diferentes fisionomias no Brasil, tornam-se importantes e vem crescendo nas últimas décadas. No entanto, as informações obtidas sobre a diversidade genética devem ser consideradas em projetos de manejo e conservação de reservas florestais, uma vez que assim, é possível garantir o potencial evolutivo das espécies.

2.2 Marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Em genética de populações, os parâmetros utilizados para medir a variabilidade genética são geralmente descritas em termos de frequências dos alelos, número ou porcentagem de alelos polimórficos e a heterozigosidade observada entre as populações. A diversidade genética é medida a partir da utilização de marcadores moleculares, tais como isoenzimas, RAPD, ISSR, microssatélites, em locos individuais, além de sequenciamento de regiões conservadas de moléculas como o DNA do cloroplasto (cpDNA), que permite inferências históricas sobre fluxo gênico e padrão de dispersão para a espécie em estudo.

Marcadores microssatélites, ou Sequências Simples Repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) são pequenas sequências (*'sequence motif'*) com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Devido à sua expressão co-dominante, multialelismo, abundância e ampla distribuição genômica, os microssatélites são, atualmente, um dos mais eficazes marcadores moleculares. Entretanto, a necessidade de sequenciamento das regiões flangeadoras para as quais os *primers* são construídos pode ser um entrave para esses estudos. Uma alternativa para diminuir os custos desses marcadores é a transferência de marcadores SSR entre espécies do mesmo gênero (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999; DECROOCQ et al., 2003; GUIDUGLI et al., 2009).

Marcadores entre repetições de sequências simples (*Inter Simple Sequence Repeat* - ISSR) (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994) utilizam um *primer* composto por repetições di-, tri-, tetra- ou pentanucleotídicas, com ou sem uma sequência de ancoragem de 1 a 3 nucleotídeos (a ausência da sequência de ancoragem diminui a reprodutibilidade

e especificidade do *primer*) que tem os microssatélites como sequência alvo. Assim como os microssatélites, os marcadores ISSR amplificam segmentos genômicos abundantes e amplamente distribuídos ao longo do genoma dos eucariontes sem, no entanto, necessitarem de sequenciamento para a construção dos *primers* (GE et al., 2005).

Durante a amplificação do DNA genômico via PCR, o *primer* único de ISSR – só uma das fitas de DNA é amplificada – produz múltiplos fragmentos de tamanhos variados (bandas), cujo padrão é analisado após separação por eletroforese para avaliar a diversidade genética. Devido à herança dominante, a presença do fragmento (banda) pode representar o homocigoto dominante ou o heterocigoto, enquanto a ausência pode se dever ao estado homocigoto recessivo (CULLEY; WOLFE, 2001), à ocorrência de inserções/deleções, ou à adição ou perda de um sítio de reconhecimento do *primer* (YANG et al., 1996; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994).

Inicialmente os marcadores ISSR tiveram seu uso restrito a espécies cultivadas, como por exemplo, milho (KANTETY et al., 1995), sorgo (YANG et al., 1996), arroz (BLAIR; PANAUD; MCCOUCH, 1999), batata (PREVOST; WILKINSON, 1999) e citrus (FANG; ROOSE, 1997). Porém, Wolfe, Xiang e Kephart (1998) destacavam o potencial da técnica para estudos em populações naturais tanto em nível populacional quanto em nível interespecífico. Enfim, os ISSRs tornaram-se uma ferramenta importante também na avaliação da diversidade e estrutura genética em populações naturais de espécies arbóreas (DESHPANDE et al., 2001; DUARTE, 2011; OLIVEIRA et al., 2012; ROH et al., 2007) propiciando conhecimentos essenciais ao planejamento de ações conservacionistas.

2.3 Marcadores cpDNA

Os cloroplastos possuem genoma próprio e boa parte das moléculas que representam este cromossomo está na forma linear (BENDICH, 2004; LILLY et al., 2001; OLDENBURG; BENDICH, 2004), circular (LILLY et al., 2001; PALMER, 1992) ou mais complexas. As moléculas se apresentam na forma de monômeros, dímeros, trímeros ou multímeros com até 900 kb (kilobases) em alguns casos (LILLY et al., 2001). Na maioria das plantas superiores, o DNA cloroplastidial é constituído por 120-180 kb (mil pares de bases) (MALIGA, 2004), com um conteúdo gênico extremamente conservado mesmo entre espécies filogeneticamente distantes (PALMER; STEIN, 1986).

Estudos recentes sobre a evolução do genoma do cloroplasto têm revelado um alto grau de conservação em tamanho, estrutura, conteúdo gênico e ordem linear dos genes entre espécies aparentadas. Este modo conservativo de evolução do cpDNA sugere que qualquer mudança em estrutura, arranjo ou conteúdo do genoma pode ter implicações filogenéticas significativas. Outra característica é sua poliploidia, sendo que em uma única célula vegetal podem existir até 10.000 cópias do DNA cloroplastidial (PALMER; STEIN, 1986). Estruturalmente, na maioria das espécies, ele é constituído de um par de regiões repetidas invertidas-IR (convencionalmente denominadas IRA e IRB), as quais são separadas por uma região de cópia única menor (SSC) e uma região de cópia única maior (LSC) (PALMER, 1992). Como a região LSC possui sequência ligeiramente menos conservada que o resto do genoma do cloroplasto, e conseqüentemente maior potencial para os estudos taxonômicos no nível de espécies, foram feitos esforços durante os últimos anos para desenvolver *primers* (inicializadores do processo de replicação do DNA) para essa região (TABERLET et al., 1991; WEISING; GARDNER, 1999).

Diferentemente do genoma nuclear avaliado por marcadores aloenzimáticos ou de DNA, o cpDNA é geralmente de herança uniparental (em angiospermas é frequentemente maternal). Consequentemente, a estrutura genética dos marcadores de cpDNA depende do fluxo gênico via dispersão de sementes, já a estrutura genética dos marcadores nucleares depende do fluxo gênico via dispersão de sementes e de pólen (PETIT; KREMER; WAGNER, 1993). Portanto, com o polimorfismo do cpDNA, espera-se uma relação direta das características de história de vida da espécie relacionada à dispersão de sementes ou colonização, quando comparado com os marcadores nucleares. Sendo assim, a análise da variação do DNA de cloroplasto dentro das espécies é uma ferramenta importante na reconstrução dos eventos históricos, como expansões e contrações das populações, migração e colonização (ENNOS et al., 1999; MCCAULEY, 1995).

Os eventos históricos e mecanismos de dispersão são fatores importantes que influenciam a estrutura e a diversidade genética em plantas. Por exemplo, a estrutura genética espacial do cpDNA de espécies de clima temperado foi interpretado como consequência das mudanças climáticas durante o Pleistoceno (KING; FERRIS, 1998; SOLTIS; GITZENDANNER, 1999; TOMARU et al., 1998). Acredita-se que, na América do Sul, a área ocupada pela floresta tropical úmida retraiu entre 10.000 e 20.000 anos atrás em decorrência das mudanças climáticas. De acordo com esta hipótese, populações de tamanho reduzido (refúgios) foram isoladas por florestas secas (GRANVILLE, 1988; PRANCE, 1973, 1982). Assim, as populações, antes contínuas, sofreram uma redução no tamanho e, provavelmente, foram submetidas ao isolamento genético. Para estas espécies, a perda de diversidade genética dentro das populações e o aumento na estrutura genética espacial são, então, esperados (efeito *bottleneck*) (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975). O cpDNA (haplóide) é particularmente sensível aos efeitos da fragmentação (por exemplo, deriva

genética e *bottlenecks*) porque tem um tamanho efetivo populacional menor do que o genoma nuclear (diploide) permitindo inferências sobre a estrutura demográfica histórica. Além disso, a dispersão de genes via sementes é, normalmente, mais limitada do que o fluxo de genes via pólen (HARE, 2001; PETIT; KREMER; WAGNER, 1993). Desta forma, somada às informações obtidas pelos marcadores nucleares, estudos do cpDNA tornam-se importante ferramenta para indicação de centros de diversidade da espécie, sendo estes locais prioritários para conservação da diversidade genética a longo prazo.

2.4 Florestas Estacionais Deciduais Sobre Afloramentos Calcários

Florestas Estacionais Deciduais (FEDs) são definidas como aquelas que ocorrem em regiões tropicais, com predominância de chuvas sazonais e um período variável de forte seca (MOONEY; BULLOCK; MEDINA, 1995). No período de seca, a vegetação perde mais de 50% das folhas (MURPHY; LUGO, 1986). A fisionomia da vegetação pode ser semidecídua a fortemente decídua, ocorrendo até abaixo do Trópico de Capricórnio (PRADO, 2000). Outros fatores físicos e climáticos importantes nas FEDs podem ser apontados (MURPHY; LUGO, 1986; PENNINGTON; LEWIS; RATTER, 2006) como solos com grande fertilidade e pH moderado a alto, áreas com alta sazonalidade de chuvas com menos de 1600 mm ano⁻¹ e pelo menos 5 meses de seca.

A Floresta Estacional Decidual têm merecido atenção devido à ausência de uma classificação fitogeográfica coerente e à falta de conhecimento sobre a ecologia desses ambientes, além da susceptibilidade à degradação (PENNINGTON; LEWIS; RATTER, 2006; WERNECK; FRANCESCHINELLI; TAMEIRÃO-NETO, 2000). Essas florestas devem representar um remanescente contínuo, interligadas num período seco do Pleistoceno, encontradas principalmente em dois grandes centros (PRADO; GIBBS, 1993): Caatingas (no Nordeste Brasileiro estendendo-se até o norte de Minas Gerais) e aos Chacos (na Argentina, sul da Bolívia, a oeste e centro Paraguai, incluindo, ainda, uma estreita faixa do Mato Grosso do Sul).

Outros núcleos menores e mais isolados de FEDs são encontrados em vales secos nos Andes na Bolívia, norte do Peru e no Brasil Central em remanescentes distribuídos como encaves, em geral sobre afloramentos de calcário em diversas fisionomias. Nos últimos dois séculos estas florestas sofreram forte perturbação, principalmente pelo desmatamento para exploração

de madeira e abertura de extensas áreas para pecuária (WERNECK; FRANCESCHINELLI; TAMEIRÃO-NETO, 2000). FEDs possuem características históricas, edafoclimáticas e fitossociológicas únicas, principalmente os remanescentes sobre afloramento rochoso de calcário (PÉREZ-(PÉREZ-GARCIA; MEAVE, 2005, 2006).

Nos afloramentos calcários há condições para o desenvolvimento de vegetação arbórea (FELFILI, 2003; SCARIOT; SEVILHA, 2000). Estas florestas ocorrem sobre relevos acidentados e estão condicionadas a forte variação climática (FELFILI et al., 2007). Segundo Felfili et al. (2007) as espécies que ocorrem em afloramentos de calcário suportam condições estressantes de solos rochosos rasos, de baixa drenagem e forte período de seca, que pode chegar a seis meses.

No Brasil central, os afloramentos calcários conservam florestas que podem ser consideradas como centros de diversidade (POREMBSKI, 2007), uma vez que abrigam espécies submetidas ao estresse climático e solos peculiares. Além disso, em algumas áreas, as florestas sobre o afloramento de calcário representam os últimos remanescentes de cobertura vegetal nativa, funcionando como ilhas em meio a uma matriz de pastagem ou áreas agrícolas.

As Florestas Estacionais Deciduais sobre afloramento calcário merecem especial atenção para a conservação desses ambientes. Em virtude do extrativismo de madeira, na grande maioria de forma ilegal para produção de carvão vegetal, e exploração de rochas calcárias para produção de cimento, as FEDs sobre afloramento estão ameaçadas pelas atividades humanas. Os afloramentos calcários podem funcionar como unidades de conservação da diversidade biológica e genética de várias espécies, algumas delas endêmicas desses ambientes.

2.5 *Ceiba pubiflora* (A.St.-Hil.) K. Schum

O gênero *Ceiba* Mill. (Malvaceae) inclui aproximadamente 17 espécies com distribuição neotropical, desde o México, América Central e Antilhas até a América do Sul. No Brasil, ocorrem 10 espécies distribuídas em todas as regiões (GIBBS; SEMIR, 2003). Dentre as contribuições mais recentes para o gênero estão as de Gibbs, Semir e Cruz (1988), na qual foi proposta a sinonimização de *Chorisia* Kunth em *Ceiba* Mill. e, posteriormente, de Gibbs e Semir (2003) sobre a revisão de *Ceiba*, onde foram reconhecidas 17 espécies e apresentadas descrições, ilustrações, mapas com a distribuição geográfica e comentários sobre as mesmas.

Ceiba pubiflora (A.St.-Hil.) K. Schum. possui marcada presença em afloramentos de calcário e distribuição desde o Mato Grosso Sul até a Caatinga do Norte de Minas Gerais e Bahia (OLIVEIRA-FILHO, 2006). Segundo Gibbs e Semir (2003), a maioria das espécies do gênero *Ceiba* ocorre restritamente em florestas sazonais secas (FEDs), sendo que a espécie *Ceiba pubiflora* parece ter uma preferência acentuada, mas não exclusiva para solos calcários.

Entre algumas características da espécie, destaca-se o tronco com intumescência, a presença de acúleos nos troncos e ramos, e as folhas compostas e digitadas, sendo os folíolos cartáceos e geralmente serreados em sua margem. A espécie perde a maioria das folhas no período reprodutivo e as inflorescências são cimosas, ou seja, os eixos das inflorescências possuem crescimento limitado, terminando em uma flor. *Ceiba pubiflora* tem efetiva polinização de suas flores realizada por beija-flores e, em menor eficiência por borboletas e morcegos. A presença de apêndices no tubo estaminal parece favorecer a polinização por beija-flores e borboletas, por facilitar o encontro do tecido nectarífero situado internamente na base do cálice (GIBBS; SEMIR, 2003). O fruto é uma cápsula

oblonga e deiscente, com sementes leves e envolvidas por arilos pilosos e brilhantes (paina), que auxiliam na dispersão anemórica. A paina pode ser usada como isolante térmico, no enchimento e na confecção de bóias e salva-vidas. A madeira, embora frágil e de baixas durabilidade e densidade, pode ser usada no enchimento e revestimento de miolo de compensados e portas, confecção de forros e brinquedos e na produção de celulose, bem como na construção de embarcações.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação genética das espécies deve ser levada em consideração em planos de manejo e conservação. Unidades de Conservação devem ajudar a manter a capacidade evolutiva da espécie, frente às mudanças ambientais. Para auxiliar nas definições dessas Unidades, os marcadores moleculares, como os ISSR e cpDNA, são importantes ferramentas que devem ser usados. Conhecer os padrões de diversidade e estrutura genética em populações arbóreas é fator chave para programas de conservação genética.

As Florestas Estacionais Deciduais (FEDs) sobre afloramento calcário são fisionomias peculiares, grandemente ameaçadas pelas atividades antrópicas e que carecem de estudos ecológicos e genéticos. Deve ser considerada a visão desses ambientes como sendo ilhas remanescentes de FEDs, e núcleos potenciais de conservação genética de espécies endêmicas (por exemplo, *Ficus bonijesulapensis*), ou de ocorrência preferencial em condições cársticas (por exemplo, *Ceiba pubiflora*).

Os esforços desse trabalho foram no sentido de conhecer a diversidade genética em populações de *Ceiba pubiflora* (A.St.-Hil.) K. Schum que ocorrem sobre afloramento de calcário, na região central do Brasil. A definição de Unidades de Conservação para a espécie, a partir de informações geradas pelos marcadores moleculares, é de fundamental importância para subsidiar programas de manejo e conservação do governo. A manutenção da diversidade genética e da dinâmica do fluxo gênico entre populações é capaz de garantir a sobrevivência das populações em longo prazo. Espera-se com este trabalho adicionar informações importantes, até então desconhecidas, sobre algumas características genéticas das populações de *Ceiba pubiflora*.

REFERÊNCIAS

- BEGON, M.; COLIN, A. T.; HARPER, J. L. **Ecology**: from individualstoecosystems. 4th ed. London: Blackwell, 2006. 751p.
- BENDICH, A.J. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. **PlantCell**, Rockville, v. 16, n. 7, p.1661-1666, July 2004.
- BIGARELLA, J.J.; ANDRADE-LIMA, D.; RIEHS, P.J. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.47, p.411-464, 1975.
- BLAIR, M.W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 5, p.780-792, Sept. 1999.
- COLLEVATTI, R.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocarbrasiliense*. **Heredity**, Washington, v.89, n. 6, p.748-756, Dec. 1999.
- CULLEY, T.M.; WOLFE, A.D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens*, as indicated by isozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, Washington, v. 86, n. 5, p.545-556, Sept. 2001.
- DECROOCQ, V. et al. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.106, n. 5, p.912-922, Mar. 2003.
- DESHPANDE, A.U. Genetic diversity across the natural populations of three montane plant species from the WG, India revealed by ISSR repeats. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, n. 10, p.2397-2408, Oct. 2001.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; TELLES, M.P.C. Spacial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, Malden, v.16, n.4, p. 924-935, Aug. 2002.

DUARTE, J.F. **Conservação genética de *Ficus bonijesulapensis* R.M. Castro em florestas decíduais sobre afloramento calcários**. 2011. 61p. Dissertação (Mestrado Ecologia Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ENNOS, R.A. et al. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: HOLLINGSWORTH, P. M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (Ed.). **Molecular systematics and plant evolution**. London: Taylor & Francis, 1999. p. 1-19.

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, Apr. 1997.

FELFILI, J.M. Fragmentos de florestas estacionais do Brasil Central: diagnóstico e proposta de corredores ecológicos. In: COSTA, R. B. (Org.). **Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na região Centro-Oeste**. Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco, 2003. p.139-160.

FELFILI, J. M. et al. Floristic composition and community structure of a seasonally deciduous forest on limestone outcrops in Central Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 611-621, out./dez. 2007.

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

FREITAS, M.L. M. et al. Variação genética em progênies de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão em três sistemas de cultivo. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.30, n.3, p. 319-329, maio/jun. 2006.

GE, X. J. et al. Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 5, p.843-851, Feb. 2005.

GIBBS, P.; SEMIR, J. Revisión taxonomicadel genero *Ceiba* Mill. (Bombacaceae). **Anales del Jardín Botánico**, Madrid, v.60, n. 2, p. 259-300, 2003.

GIBBS, P. E.; SEMIR, J.; CRUZ, N. D. A proposal to unite genera *Chorisia* Kunth. and *Ceiba* Miller. (Bombacaceae). **Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh**, Edinburgh, v. 45, n. 1, p.125-136, 1988.

GRANVILLE, J. J. de. Phytogeographical characteristics of the Guianan forests. **Taxon**, Utrecht, v.37, n. 3, p.578-594, Aug. 1988.

GUIDUGLI, M.C. et al. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Carinianaestrellensis* and transferability to *Carinianalegalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, Berlin, v. 10, n. 4, p. 1001-1004, Aug. 2009.

HARE, M.P. Prospects for nuclear gene phylogeography. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.16, n. 12, p.700-706, Dec. 2001.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 542 p.

KANTETY, R.V. et al. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, n. 4, p. 365-373, July 1995.

KING, R.A.; FERRIS, C. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, n. 9, p.1151-1161, Feb. 1998.

LEDRU, M.P. Late quaternary environmental and climate changes in Central Brazil. **Quaternary Research**, San Diego, v.39, n. 1, p.90-98, Feb. 1993.

LILLY, J.W. et al. Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 2, p.245-254, Feb. 2001.

MALIGA, P. Plastid transformation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, n. 55, p.289-313, 2004.

MANEL, S. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v.18, n.4, p. 189-197, Aug. 2003.

MCCAULEY, D.E. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. **Trends in Evolution & Ecology**, London, v.10, n. 5, p.198-202, May 1995.

MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. The one-migrant-pergeneration rule in conservation and management. **Conservation Biology**, Essex, v. 10, n. 6, p. 1509-1518, Jan. 1996.

MOONEY, H.A.; BULLOCK, S.H.; MEDINA, E. Introduction seasonally dry tropical forests. In: _____. **Seasonally dry tropical forests**. New York: Cambridge University, 1995. p. 1-8.

MORAES, P.L.R.; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocaryamoschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.22, n.2, p.237-248, out. 1999.

MURPHY, P. G.; LUGO, A. E. Ecology of tropical dry forest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 17, p. 67-88, 1986.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, Lancaster, v.29, p.1-10, 1975.

NEWTON, A.C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v.14, n. 1, p.140-145, Apr. 1999.

OLDENBURG, D.J.; BENDICH, A.J. Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. **Journal of Molecular Biology**, London, v.335, n. 4, p. 953-970, Jan. 2004.

OLIVEIRA, D.A. et al. Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 531-538, Feb. 2012.

OLIVEIRA-FILHO, A.T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais: mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2006. 423p.

PÁDUA, J.A.R. **Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e a conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macheish no Estado de Minas Gerais**. 2011. 80p. Dissertação (Mestrado Ciências Florestais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PALMER, J.D. Cell organelles. In:HERRMANN, R. G. (Ed.).**Plant gene research**.Vienna: Springer-Verlag, 1992. p.99-122.

PALMER, J.D.; STEIN, D.B. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants.**Current Genetics**, New York, v.10, n. 3, p.823-833,Mar. 1986.

PENNINGTON, R.T.;LEWIS, G.P.;RATTER, J.A.An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of Neotropical savannas and seasonally dry forests.In: _____.**Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography and conservation**.Boca Raton:CRC, 2006. p. 1-29.

PENNINGTON, R.T.; PRADO, D.A.; PENDRY, C. Neotropical seasonally dry forests and quaternary vegetation changes.**Journal of Biogeography**, Oxford, v.27, n. 2, p.261-273, Mar. 2000.

PÉREZ-GARCÍA, E.A.; MEAVE, J.A. Coexistence and divergence of tropical dry forests and savannas in southern Mexico.**Journal of Biogeography**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 438-447, Mar. 2006.

_____. Heterogeneity of xerophytic vegetation of limestone outcrops in a tropical deciduous forest region in southern Mexico. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 175, n. 1, p. 147-163, Feb. 2005.

PETIT, R.J.; KREMER, A.; WAGNER, D.B. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants.**Heredity**, Washington, v. 71, n. 4, p.630-641,Dec. 1993.

POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 579-586, out./dez. 2007.

PRADO, D. E. Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. **Edinburgh Journal of Botany**,Edinburgh, v. 57, n. 3, p. 437-461, 2000.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South-America.**Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 80, n. 4, p. 902-927, Aug. 1993.

PRANCE, G.T. **Biological diversification in the tropics**. New York: Columbia University, 1982. 137p.

PRANCE, G.T. Phytogeographic support for the theory of Pleistocene forest refuges in the Amazon Basin, based on evidence from distribution patterns in Caryocaraceae, Chrysobalanaceae, Dichapetalaceae and Lecythidaceae. **Acta Amazonica**, Manaus, v.3, p.5-26, 1973.

PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 1, p.107-112, Jan. 1999.

ROH, M.S. et al. Characterization of wild *Prunus yedoensis* analyzed by inter-simple sequence repeat and chloroplast DNA. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 121-128, Apr. 2007.

SANTOS, R.M. et al. Identity and relationships of the Arboreal Caatinga among other floristic units of seasonally dry tropical forests (SDTFs) of north-eastern and Central Brazil. **Ecology and Evolution**, Athens, v. 2, n. 2, p. 409-428, Feb. 2012.

SCARIOT, A.; SEVILHA, A.C. Diversidade, estrutura e manejo de florestas decíduas e as estratégias de conservação. In: CAVALCANTI, T. B. et al. (Ed.). **Tópicos atuais em botânica**. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil; EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p.183-188.

SEBBENN, A.M.; ETTORI, L.C. Conservação genética ex situ de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltrochorum dubium* em teste de progênies misto. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 22, p. 201-211, 2001.

SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã) Forest fragmentation effects in population genetic structure of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.57, p.123-139, jun. 2000.

SLATKIN, M. The average number of sites separating DNA sequences drawn from a subdivided population. **Theoretical Populations Biology**, London, v. 32, n. 1, p. 42-49, Mar. 1987.

- SOLTIS, P.S.; GITZENDANNER, M.A. Molecular systematics and the conservation of rare species. **Conservation Biology**, Boston, v.13, n. 3, p.471-483, June 1999.
- SOUZA, L.M.F.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 65, p.70-79, jun. 2004.
- TABERLET, P. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.17, n. 5, p.1105-1109, July 1991.
- TOMARU, N. et al. Intraspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus srenata* (Fagaceae) mitochondrial DNA. **American Journal of Botany**, Columbus, v.85, n. 5, p.629-636, May 1998.
- WANG, J. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. **Conservation Biology**, Essex, v. 18, n. 2, p. 332-343, Apr. 2004.
- WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v.42, n. 1, p.9-19, Feb. 1999.
- WERNECK, M.S.; FRANCESCHINELLI, E.V.; TAMEIRÃO-NETO, E. Mudanças na florística e estrutura de uma floresta decídua durante um período de quatro anos (1994-1998), na região do Triângulo Mineiro, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, n. 4, p.401-413, out./dez. 2000.
- WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1107-1125, Sept. 1998.
- WRIGHT, S. Genetical structure of population. **Annals of Eugenics**, New York, v. 15, p. 395-420, 1951.
- _____. Isolation by distance. **Genetics**, Austin, v. 28, p. 114-138, 1943.
- YANG, W. et al. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 6, p.1669-1676, June 1996.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 1, p.176-183, Mar. 1994.

SEGUNDA PARTE: ARTIGOS

ARTIGO I:***Ceiba pubiflora* (MALVACEAE): DIVERSIDADE GENÉTICA EM AFLORAMENTOS CALCÁRIOS NO BRASIL CENTRAL****RESUMO**

As Florestas Estacionais Deciduais (FED's) que se encontram sobre afloramento calcário estão sujeitas à degradação pela retirada de madeira e exploração de calcário, para produção de cimento. Algumas dessas florestas representam os últimos remanescentes de cobertura vegetal nativa, funcionando como ilhas de vegetação. As espécies arbóreas que se estabelecem nesses remanescentes carecem de informações relativas à ecologia e à genética. A espécie arbórea *Ceiba pubiflora* (Malvaceae) possui uma ocorrência comum nos afloramentos calcários no Brasil central. Objetivou-se neste trabalho verificar a diversidade genética em populações naturais de *C. pubiflora* localizadas no Brasil central e, indicar aquelas prioritárias para funcionar como Unidades Operacionais de conservação. Marcadores ISSR foram utilizados para estimar os índices de diversidade genética de 10 populações naturais de *C. pubiflora* amostradas no domínio da Caatinga, Cerrado e Atlântico. Os *primers* ISSR produziram 95 locos, sendo 93 polimórficos. A espécie apresentou alta diversidade genética ($H_T=0,345$; $P_{LP}=97,89\%$). As populações SAH, JAN e MON apresentaram os maiores índices de locos polimórficos e alta diversidade genética. As populações BJL e MIN apresentaram baixa densidade populacional e baixos índices de diversidade. O fluxo gênico ocorreu com maior intensidade entre populações mais próximas geograficamente. A AMOVA revelou que maior parte da variabilidade genética ocorre dentro das populações (91,5%). Pela análise Bayesiana, as dez populações foram distintas em cinco grupos ($K=5$). Três barreiras para o fluxo gênico foram apontadas na paisagem: Planalto Central ou vale do Paranã; proximidades da cadeia do Espinhaço ou vale do rio São Francisco e serra da Mantiqueira; Chapada dos Veadeiros e áreas antropizadas. Existe correlação positiva entre a distância genética (θ^B) e geográfica ($r = 0,428$; $p = 0,008$). Unidades Operacionais podem ser criadas (1) na região sul de Minas Gerais, (2) na região central de MG, (3) no norte de MG e sul da Bahia e (4) no Planalto Central, em Goiás.

Palavras-chave: ISSR, Fluxo Gênico, Conservação Genética, Unidades Operacionais.

ABSTRACT

The Seasonal Dry Tropical Forests on limestone outcrops are subject to degradation by logging timber and exploitation of limestone for cement production. Some of these forests represent the last remnants of native vegetation cover, operating as islands. The tree populations established in these remaining needs of information on genetic aspect. The species *Ceiba pubiflora* (Malvaceae) commonly occurs on limestone outcrops in central region of Brazil. The flowers of this species are pollinated by hummingbirds and seed dispersal anemochoric. The objectives of this study were to evaluate the genetic diversity in natural populations of *C. pubiflora* in central region of Brazil, and indicate those for the formation of Management Unites (MU) for conservation. ISSR markers were used to estimate the levels of genetic diversity in 10 populations sampled in the area of Caatinga, Cerrado and Atlantic biome. Eight ISSR primers produced 95 loci, 93 polymorphic. The species had high genetic diversity ($H_T = 0.345$; $P_{LP} = 97.89\%$). Populations SAH, JAN and MON have higher rates of polymorphic loci (90.5%, 86.3% and 84.2%, respectively) and high genetic diversity ($H_e = 0.348$, 0.338 and 0.325, respectively). These populations were also those that most contributed to gene flow. The BJL and MIN populations showed low H_e (0.101 and 0.143, respectively) and low P_{LP} (24.2% and 26.3% respectively). These populations had low population density. AMOVA revealed that most genetic variation occurs within populations (91.5%) than between them. For Bayesian analysis, the ten populations were clustered into five groups ($K = 5$), being appointed at least three barriers to gene flow in the landscape: the Central Plateau or Paranã river valley; near of the Espinhaço, or the river São Francisco valley, and the Mantiqueira mountain range, Chapada dos Veadeiros plateau and disturbed areas. For the Mantel test, there is positive and significant correlation between genetic distance (θ^B) and geographic ($r = 0.428$, $p = 0.008$) and negative significant relationship between gene flow and geographic distance ($r = -0.3$, $p = 0.028$). Management Unites can be created (1) in the southern region of Minas Gerais (e.g. MI), other (2) in central Minas Gerais (e.g. SH), (3) in the north of Minas Gerais and southern Bahia (e.g. MO) and (4) in the Central Plateau in Goiás.

Keywords: ISSR, Gene Flow, Conservation Genetic, Management Unites.

1 INTRODUÇÃO

As Florestas Estacionais Deciduais (FEDs) estão sujeitas à degradação, principalmente pelo avanço das fronteiras agrícolas e expansão dos centros urbanos. FEDs possuem características históricas, edafoclimáticas e fitossociológicas únicas, principalmente os remanescentes sobre afloramentos rochosos de calcário (PÉREZ-GARCIA; MEAVE, 2005, 2006). Em muitos locais, os afloramentos calcários formam manchas de habitats para diversas espécies e, funcionam como relicários de diversidade genética.

Florestas Estacionais Deciduais são definidas como aquelas que ocorrem em regiões tropicais, que se destacam pela predominância de chuvas sazonais e um período variável de forte seca (MOONEY; BULLOCK; MEDINA, 1995). No período de seca, a vegetação perde mais de 50% das folhas (MURPHY; LUGO, 1986). Beard (1944, 1955) sugeriu o conceito de florestas sazonais da América do Sul como ‘séries de formações sazonais’, que agrupam tipos estruturais de vegetação associados com a sazonalidade climática nos trópicos, que apresenta uma estação seca bem definida com comprimento variável. Desta forma, a fisionomia da vegetação pode ser semidecídua a fortemente decídua, ocorrendo até abaixo do Trópico de Capricórnio (PRADO, 2000). Outros fatores físicos e climáticos importantes nas FEDs podem ser apontados (MURPHY; LUGO, 1986; PENNINGTON; LEWIS; RATTER, 2006) como solos com grande fertilidade e pH moderado a alto, áreas com alta sazonalidade de chuvas com menos de 1600 mm ano⁻¹ e pelo menos cinco meses de seca.

Atualmente, a distribuição das FEDs no continente Sul Americano é descontínua. Estende-se da Caatinga no Nordeste do Brasil até o vale do Rio Uruguai e áreas menores na Bacia Amazônica estendendo até o México. Prado e Gibbs (1993) apontam três grandes núcleos principais: o ‘núcleo da Caatinga’ no

Nordeste do Brasil; ‘núcleo de Misiones’ ao longo do sistema dos rios Paraguai-Paraná; e ‘núcleo Subandean Piedmont’ no sudoeste da Bolívia e noroeste da Argentina. Outros núcleos menores e mais isolados são encontrados em vales secos nos Andes na Bolívia, norte do Peru e no Brasil Central em remanescentes distribuídos como enclaves, em geral sobre afloramentos de calcário em diversas fisionomias. Essas florestas devem representar um remanescente contínuo, interligadas num período seco do Pleistoceno, aproximadamente há 21000 anos (PRADO; GIBBS, 1993; PENNINGTON et al., 2004).

Os afloramentos calcários no Brasil em áreas de clima sazonal favorecem a ocorrência de formações florestais. Observa-se nesses ambientes espécies da vegetação selecionadas por sua resistência à seca, sendo algumas delas restritas a ambientes rochosos e outras ocorrendo também em ambientes mais méxico, mesmo em outros tipos de formação vegetal (FELFILI et al., 2007). No Brasil central, os afloramentos calcários conservam florestas que podem ser consideradas como centros de diversidade (POREMBSKI, 2007), uma vez que abrigam espécies submetidas ao estresse climático e solos peculiares. Além disso, em algumas áreas, as florestas sobre o afloramento de calcário representam os últimos remanescentes de cobertura vegetal nativa, funcionando como ilhas em meio a uma matriz de pastagem ou áreas agrícolas.

Desta forma, a diversidade genética das populações de espécies arbóreas nestas paisagens é de fundamental importância para a manutenção das populações ao longo do tempo. Frente à constante ameaça que esses ambientes estão sujeitos, seja pela exploração do calcário pelas fábricas de cimento, extrativismo madeireiro ou expansão das fronteiras agrícolas, as Florestas Estacionais Deciduais sobre afloramento de calcário merecem atenção. Em especial estudos sobre a diversidade genética em populações nesses remanescentes, buscando indicar aquelas que funcionem como Unidades de Conservação, utilizando-se da Genética da Paisagem.

A genética da paisagem é uma área de pesquisa interdisciplinar, emergente nessa última década, que combina genética de populações, ecologia de paisagem e estatística espacial (BALKENHOL; WAITS; DEZZANI, 2009; MANEL et al., 2003; STORFER et al., 2007). Essas informações são ferramentas importantes para propor a criação de unidade de conservação e coleta de sementes, para eficiente amostragem da variabilidade genética das espécies. A indicação dessas áreas visa aquelas populações que, sendo preservadas, sejam capazes de garantir a manutenção da herança evolutiva da espécie, as chamadas Unidades Operacionais (UO ou ESU's) como discutido em Diniz-Filho e Telles (2002), Taylor e Dizon (1999) e Telles et al. (2003).

Entre as diversas espécies arbóreas que ocorrem nas Florestas Estacionais Deciduais sobre afloramento calcário no Brasil central, destaca-se a *Ceiba pubiflora* (A.St.-Hil.) K. Schum (Malvaceae). Essa espécie produz flores na estação seca (junho a agosto), visitadas por abelhas e beija-flores, sendo uma importante fonte de recursos também para outras espécies, que se alimenta das flores que caem no chão, depois de serem fecundadas. As sementes são leves e envolvidas por arilos pilosos que auxiliam na dispersão anemocórica (GIBBS; SEMIR, 2003). *Ceiba pubiflora* foi escolhida para esse estudo de diversidade genética utilizando marcadores moleculares. Essa espécie comumente ocorre nos afloramentos calcários, sendo encontrada em todos os locais propostos para este trabalho, sendo um modelo de estudo dos padrões de diferenciação genética entre populações e regiões.

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter-simple sequence repeats*) podem ser usados para estudos de diversidade genética em populações de plantas, examinando locos nucleares não codificantes (GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Estes marcadores têm se mostrado promissores, em estudos de populações de espécies arbóreas naturais,

pela sua característica hiper-variável (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011; CULLEY; WOLFE, 2001; GE; SUN, 1999; SOUZA; LOVATO, 2010).

Buscando estabelecer práticas conservacionistas eficientes para a espécie *C. pubiflora* é importante pesquisar a variabilidade genética dentro e entre populações. Estudos de genética de populações podem indicar alguns aspectos importantes da biologia da conservação, como por exemplo, a perda de diversidade genética em populações pequenas e isoladas (AGUILAR et al., 2008; SOUZA; LOVATO, 2010). Desta forma, objetivou-se neste presente estudo, verificar a diversidade genética em dez populações naturais de *Ceiba pubiflora*, distribuídas no Brasil Central, com utilização de marcadores ISSR, e verificar as seguintes hipóteses: (1) as populações de *Ceiba pubiflora*, em fragmentos naturais sobre afloramento calcário, conservam alta diversidade genética; (2) barreiras geográficas históricas limitam o fluxo gênico entre as populações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização das Populações e Coleta de Material

Para o estudo de diversidade genética, utilizando marcadores moleculares ISSR, amostras foliares de *Ceiba pubiflora* foram coletadas em 10 localidades nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (Tabela 1, Figura 1). Em caminhamento pelos fragmentos amostrados, foram coletados todos os indivíduos encontrados de *C. pubiflora*. As amostras foliares foram acondicionadas em saco plástico, contendo sílica gel para desidratação do tecido. Ao término das coletas, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, do Departamento de Ciências Florestais, da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

As populações amostradas são fragmentos de Florestas Estacionais Deciduais Submontanas e Montanas, sobre afloramentos de rocha carbonática e, uma população (Minduri – MG), que não está sobre afloramento calcário, mas em Floresta Estacional Semidecidual Baixomontana. As populações encontram-se nos domínios do Cerrado, Atlântico e Caatinga (AB’SABER, 2003; VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 2001). Em geral, seu entorno é composto por Florestas Estacionais Deciduais, inseridas em matriz antropizada, com áreas destinadas ao cultivo de monoculturas ou pastagem.

Tabela 1 Locais e tamanho amostral utilizado para o estudo de diversidade genética de *Ceiba pubiflora*. N = Tamanho amostral.

Locais	Códigos	Estado	N	Coordenadas (S/W)		Domínio
Bom Jesus da Lapa	BJL	BA	03	13°03'13,9"S	43°17'28,6"W	Caatinga
Montalvânia	MON	MG	16	14°28'21,0S	44°22'14,8"W	Caatinga
Januária	JAN	MG	16	15°08'03,1"S	44°14'58,4"W	Caatinga
Nova Roma	NOR	GO	10	13°42'25,7"S	46°51'14,5"W	Cerrado
Vila Propício	VIP	GO	19	15°29'14,0"S	48°51'52,7"W	Cerrado
Santo Hipólito	SAH	MG	16	18°17'23,7"S	44°11'13,9"W	Cerrado
Matozinhos	MAT	MG	13	19°33'08,9"S	44°04'14,4"W	Atlântico
Arcos	ARC	MG	03	20°19'52,5"S	45°34'43,8"W	Atlântico
Doresópolis	DOR	MG	03	20°18'25,2"S	45°55'08,5"W	Atlântico
Minduri	MIN	MG	05	21°39'53,4"S	44°37'50,6"W	Atlântico
Total			106			

Classificação segundo Ab'Saber (2003) e Veloso, Rangel-Filho e Lima (2001).

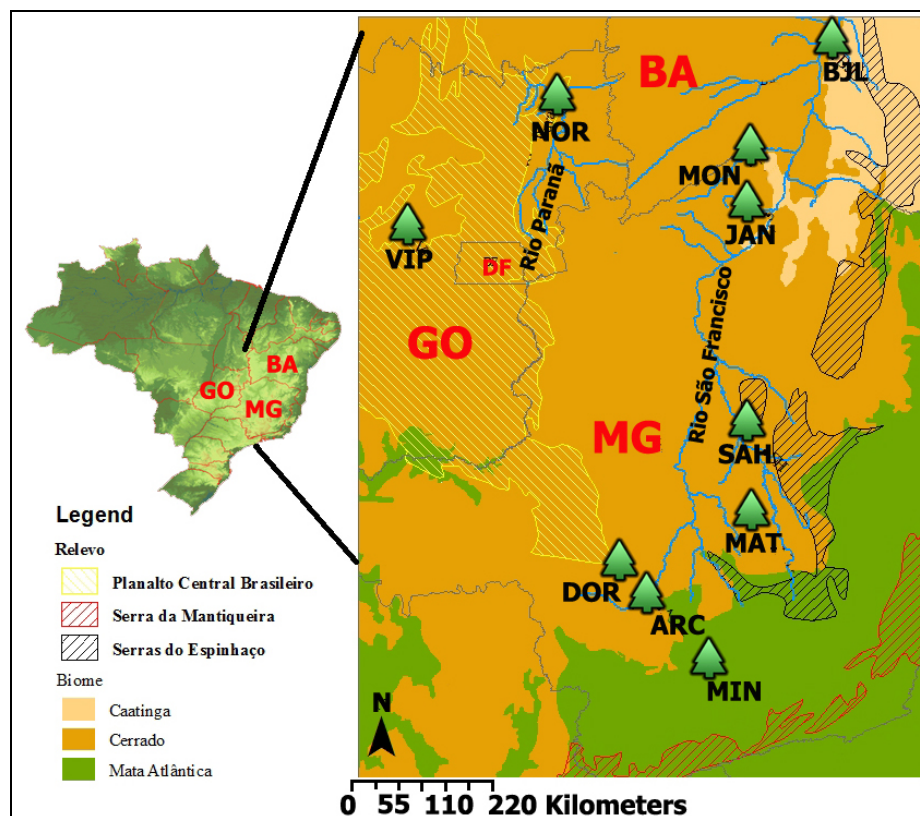


Figura 1 Localização das populações amostradas de *Ceiba pubiflora*. GO: Goiás, MG: Minas Gerais, BA: Bahia, DF: Distrito Federal. Imagem: ARCGIS v.9.3. Classificação segundo Ab'Saber (2003) e Veloso, Rangel-Filho e Lima (1991).

2.1. Extração do DNA e PCR-ISSR

Realizou-se a extração de DNA genômico dos 106 indivíduos coletados de *C. pubiflora*, pelo método descrito em Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações, onde se utilizou: 100 mM de Tris pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM

de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; 1% (p/v) PVP-40 e 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol pré- aquecido a 65 °C. Após a extração, o DNA foi solubilizado em TE (Tri mM; EDTA mM) e armazenado a -20 °C até o momento da reação de PCR-ISSR. O DNA concentrado foi diluído em TE a uma concentração final de aproximadamente 5 ng/ μ l para as reações de PCR-ISSR.

A amplificação dos fragmentos de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-ISSR) foi conduzida em 12 μ L, constituído de aproximadamente 10ng de cada amostra de DNA, tampão de reação 1x (500 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 2,5 mgmL⁻¹ BSA; 200 mM Tartrazina e 1% Ficoll), 2,6 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP; 0,125 U Taq DNA Polimerase (Phoentria) e 0.4 μ M de *primer* ISSR. O programa de amplificação na PCR constituiu-se de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, e de 37 ciclos com: desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 42 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Foram testados 15 *primers* ISSR sendo selecionados oito (Tabela 2), os quais apresentaram perfil nítido de amplificação dos fragmentos de DNA. Os fragmentos amplificados de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em solução 0,5X de TBE (90 mM Tris, 92 mM ácido bórico e 2,5 mM EDTA), corado com brometo de etídio, fotografados sobre luz ultravioleta (Figura 2) e utilizado o software de análise de imagens *UVP Doc-It-LS*. A matriz binária, gerada a partir da genotipagem do gel quanto à presença (1) ou ausência do fragmento (0), foi utilizada para calcular as estimativas de diversidade genética para as populações de *C. pubiflora*. Somente dados inequívocos obtidos pelos fragmentos de DNA foram utilizados para análise.

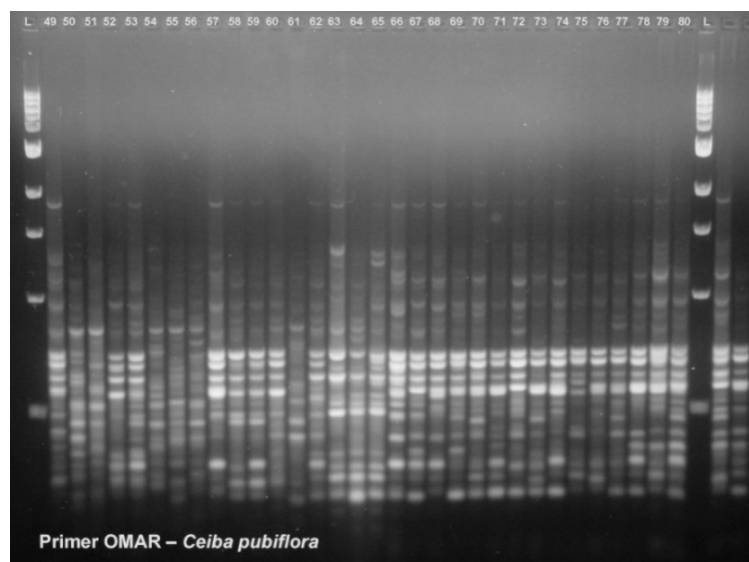


Figura 2 Imagem dos fragmentos de DNA amplificados de *Ceiba pubiflora* (indivíduos nº 49 ao 80) em gel de agarose, para o *primer* ISSR Omar. L = marcador de peso molecular 1 Kb.

2.3 Análise dos Dados

2.3.1 Número de locos polimórficos

Para estimar o número de locos polimórficos necessários para obter associações estáveis entre os indivíduos, foi utilizada a técnica de *bootstrap*, com auxílio do programa GENES (CRUZ, 2001). Para cada par de indivíduos, a similaridade genética foi estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos, com 10.000 permutações. Com isto, foram obtidas as estimativas de correlação de valores de matriz de similaridade com outras matrizes geradas com diferentes números de fragmentos. Quando o índice *E*

(estresse) atingir valor inferior a 0,05, o número de locos é considerado suficiente para as demais análises genéticas (KRUSKAL, 1964).

Adicionalmente, verificou-se o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC). O valor de PIC indica a eficiência dos *primers* ISSR utilizados em detectar polimorfismo entre dois indivíduos, retirados aleatoriamente da amostra total. Para cálculo do PIC utiliza-se a fórmula: $PIC = 2Pi (1-Pi)$, sendo Pi a frequência de fragmentos polimórficos amplificados, e $1-Pi$ a frequência do alelo nulo. Desta forma, o valor de PIC pode variar entre 0,0, ou seja, marcadores monomórficos, e 0,5 para marcas presentes em 50% dos indivíduos e ausentes nos outros 50% (BOTSTEIN et al., 1980; CHAKRABORTY; FUERST; FERRELL, 1979; ROLDAN-RUIZ et al., 2000).

2.3.2 Diversidade Genética

A caracterização da variabilidade genética foi realizada no programa POPGENE v.1.32 (YEH, 1997), utilizando parâmetros para dados diploides dominantes, onde a estatística de variabilidade genética para cada população foi calculada conforme Nei (1987). Tendo em vista a natureza dominante dos dados, esse programa pressupõe, para os cálculos das estimativas das frequências alélicas, que os locos estejam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas foram estimadas a partir da raiz quadrada da frequência do genótipo nulo (recessivo). Foi estimada a porcentagem de locos polimórficos totais e em cada população; Heterozigosidade esperada (H_e), calculada pela fórmula: $H_e = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência da banda i ; Índice de Shannon (I) de diversidade fenotípica, estimado pela fórmula: $I = -\sum p_i \ln p_i/n$, onde p_i é a frequência da banda e n é o número de marcadores avaliados; e identidade genética de Nei (1978), para todos os pares de populações.

As análises de diversidade genética de *Ceiba pubiflora* foram obtidas pelo método de Nei (1987). Foram estimadas a heterozigosidade total (H_T), a diversidade genética média dentro das populações (H_S), e o fluxo gênico (Nm), pelo cálculo indireto dado pela fórmula: $Nm = 0,25 (1 - G_{ST-B}) / G_{ST-B}$ (MCDERMOTT; MCDONALD, 1993), onde G_{ST-B} (coeficiente de diferenciação populacional) obtido por cálculo Bayesiano, pelo programa HICKORY v.1.1. O fluxo gênico também foi estimado, pelo mesmo cálculo indireto, entre os pares de população, para verificar aquelas que mais contribuíram para a movimentação de alelos entre elas, com auxílio do programa HICKORY v.1.1 (HOLSINGER; LEWIS, 2007). Verificou-se a contribuição percentual de cada população para o fluxo gênico total entre os pares de população. Aplicou-se o teste de Mantel, com o programa PC-Ord 4.14 (MCCUNE; MEFFORD, 1997), para verificar se existe correlação entre a matriz dos dados do fluxo gênico entre os pares de populações e matriz de distância geográfica.

2.3.3 Estrutura Genética

A Análise de Variância Molecular – AMOVA (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) foi empregada para discriminar da variância genética total, os componentes de covariância devido às diferenças em nível intra e inter indivíduos e/ou entre subpopulações dentro de populações (WEIR, 1990). A análise baseia-se nas distâncias genéticas tratadas como desvios da média de um grupo e utiliza os quadrados dos desvios como variância, permitindo a partição da variação genética entre e dentro das populações. As somas de quadrados convencionais (SQ) podem ser escritas na forma de somas de quadrados de diferenças entre pares de observações, construindo uma análise de variância molecular hierárquica, partindo diretamente da matriz das distâncias

quadradas de todos os pares de haplótipos (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

A abordagem Bayesiana (HOLSINGER; LEWIS; DEY, 2002) foi utilizada para obter o índice de divergência genética θ^B entre os pares de populações, com auxílio do programa HICKORY v1.1 (HOLSINGER; LEWIS, 2007). Esse programa também foi utilizado para obter os valores de heterozigosidade genética total (H_{T-B}) e heterozigosidade média dentro da população (H_{S-B}), pelo método Bayesiano. O valor de θ^B é calculado usando quatro diferentes modelos para marcadores dominantes: modelo livre, onde se estima os valores de endogamia; modelo $\theta^B = 0$ e modelo $f = 0$, onde fixam os valores de θ^B e f em zero; e modelo completo, onde se assume todas as possibilidades anteriores. As simulações são obtidas pelo método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) (BATISTINI et al., 2009). O modelo escolhido a partir da observação dos valores do DIC (*Deviance Information Criterion*), adotando-se aquele com menor valor de DIC (SPIEGELHALTER et al., 2002). A representação simplificada das divergências genéticas (θ^B) foi realizada pela construção de dendrogramas pelo método de agrupamento UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average* (SNEATH; SOKAL, 1973), adotando a rotina SAHN (*Sequential Agglomerative, Hierarchical & Nested Clustering*) com auxílio do programa NTSYS v2.11 (ROHLF, 2000).

Com a finalidade de verificar a ocorrência de diminuições contemporâneas significativas do tamanho efetivo devido à colonização recente, foi usado o programa Bottleneck 1.2.02 (CORNUET; LUIKART, 1997). Essa análise se baseia no princípio de que as populações que passaram por um recente e forte gargalo genético mostram uma rápida redução do número de alelos (NEI; ROYCHOUDHURY, 1974). Realizou-se essa análise em todos os locos assumindo o ajuste no Modelo de Alelo Infinito de Mutação (IAM), segundo

Kimura e Crow (1964). A significância foi avaliada usando o teste hierárquico de Wilcoxon (*Wilcoxon signed rank test*), baseado em 1000 replicações.

O teste de Mantel foi aplicado, com auxílio do programa PC-Ord 4.14 (MCCUNE; MEFFORD, 1997), para verificar a existência de correlação entre a matriz de distância genética (θ^B) e matriz de distância geográfica dos pares de populações. Esse teste também foi empregado para verificar a correlação entre classes de distâncias geográficas com as distâncias genéticas (θ^B). Com isso, buscou verificar o padrão de estrutura espacial entre as populações, sendo as classes de distância geográficas definidas de forma a manter o mesmo número de conexões entre populações. Assim, obtém um correlograma multivariado, correlacionando o aumento das classes de distâncias com as distâncias genéticas (ver TELLES et al., 2007).

Para inferir o número de grupos genéticos (K) que as populações amostradas representam, foi utilizada análise Bayesiana (Structure v.2.2) (PRITCHARD; WEN, 2010). O número de grupos genéticos (K) variou de k=1 a k=10, sendo estimado usando o modelo de ancestralidade não misturada (*no admixture*) com a frequência de alelos correlacionados, sendo realizadas 12 corridas independentes para cada K. Cada corrida constituiu de 100.000 repetições em Cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC) e *burn-in* de 50.000. O número de K populações é obtido pelo cálculo médio de cada K pelo modelo *Log-likelihood*, '*log of probability*' (LnP(D)), onde espera-se que o número de grupos genéticos seja o valor K máximo observado, ou com o menor número negativo de Ln (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

O programa Barrier v.2.2 (MANNI; GUÉRARD; HEYER, 2004) foi utilizado para indicação de descontinuidades genéticas no espaço, pelo método de triangulação de *Delaunay*, identificadas pelo algoritmo de Monmonier (MANNI; GUÉRARD; HEYER, 2004) a partir das coordenadas geográficas obtidas por Sistema de Posicionamento Global (GPS) e das distâncias genéticas

(θ^B). Com as coordenadas geográficas de cada população, é construído um mapa, aplicando o método de triangulação de *Delaunay* para conectá-las em uma rede, formada por um conjunto de três pontos (ABC), sendo ligados somente se um círculo que passe sobre elas não inclua nenhuma outra população. Seguindo método proposto por Legendre e Legendre (1998), a descontinuidade dos dados multivariados foi obtida pela divisão das distâncias genéticas de cada ligação ABC da rede pela distância geográfica. A descontinuidade é delimitada pelos valores mais elevados encontrados ao longo da rede de *Delaunay* (ver: LEGENDRE; LEGENDRE, 1998; MANEL et al., 2003).

Foram propostas Unidades Operacionais (UO's) para conservação genética da espécie *Ceiba pubiflora* com base nos dados obtidos de diversidade e estrutura genética, e correlograma de Mantel, segundo proposto em Diniz-Filho e Telles (2002). Esses autores sugerem a definição de Unidades Operacionais baseando-se no padrão espacial da variabilidade genética, obedecendo a uma distância mínima entre populações, onde podem ser consideradas independentes geneticamente.

3 RESULTADOS

3.1 Marcadores ISSR

Os oito *primers* ISSR utilizados neste estudo geraram 95 locos com perfil nítido para identificação em todos os indivíduos, sendo que 93 locos foram polimórficos (97,9%). O número de locos variou de 6 a 19 com média de 11 locos (Tabela 2) e tamanho variando de 300 a 2500 bp. O valor de PIC variou de 0,309 a 0,439, com média de 0,369. Em 72 locos o valor de PIC foi superior a 0,3 (Figura 3), demonstrando que os marcadores são eficientes para identificar polimorfismos entre os indivíduos.

Tabela 2 *Primers* utilizados para amplificação do DNA genômico de *Ceiba pubiflora*, suas respectivas sequências, número de locos amplificados, número de locos polimórficos e valor do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC).

<i>Primer ISSR</i>	Sequência (5'-3')	Nº de Locos	Nº de Locos Polimórficos	PIC
UBC 825 (AC)8T	ACA CAC ACA CAC ACA CT	14	14	0,337
UBC 835 (AG)8-YC	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	8	7	0,439
UBC 842 (GA)8-YG	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	11	10	0,414
UBC 857 (AC)8YG	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	13	13	0,309
UBC 888 BDB(CA)7	BDB CAC ACA CAC ACA CA	19	19	0,356
OMAR (GAG)4-RC	GAG GAG GAG GAG RC	17	17	0,370
CHRIS (CA)7-YG	CAC ACA CAC ACA CAY G	7	7	0,346
UBC 841 (GA)8-YC	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	6	6	0,379
TOTAL/Média		95	93	0,369

Onde: R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T); B = (C,G,T i.e. não A) D = (A,G,T i.e. não C).

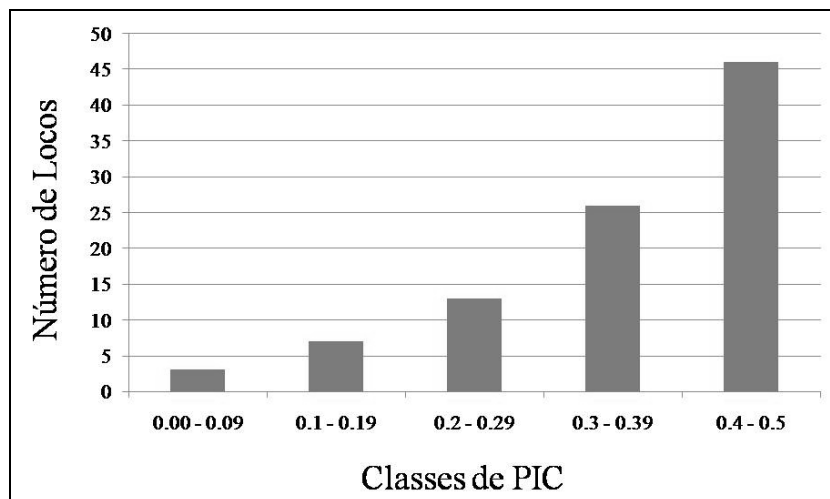


Figura 3 Classes dos valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) para os locos (total 95 locos) obtidos para *Ceiba pubiflora*, utilizando primers ISSR, para classes de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica).

A análise do número ótimo de locos, obtida com auxílio do programa GENES (CRUZ, 2001), mostrou que 87 locos foram suficientes para se estimar os índices de diversidade genética de *C. pubiflora*. O valor de estresse observado para 87 locos (0,041) indica o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada, com correlação de 0,986 (Gráfico 1), ou seja, a quantidade de locos utilizados nas análises foram suficiente para encontrar estimativas confiáveis de diversidade genética.

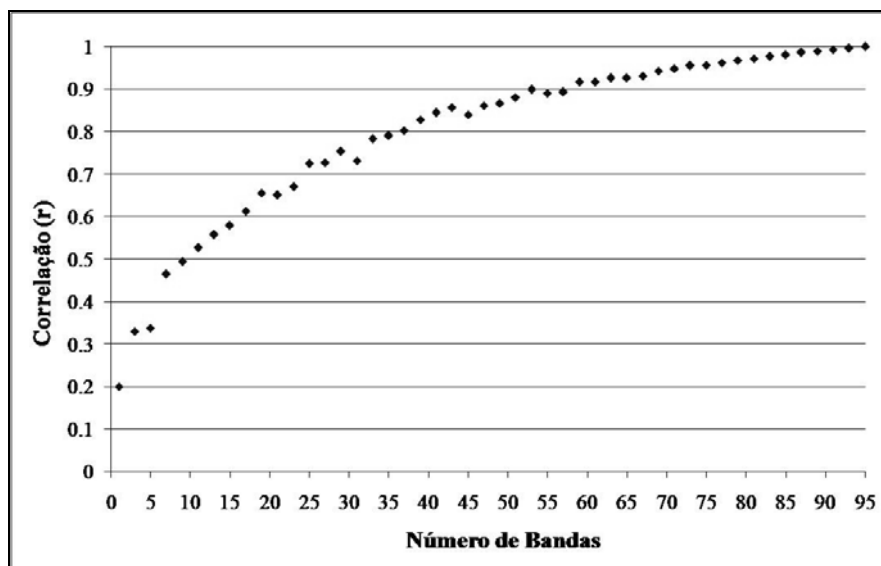


Gráfico 1 Correlação entre o número de locos (fragmentos) e o valor de estresse (r) obtida por meio de *bootstrap*, para *Ceiba pubiflora*.

3.2 Diversidade Genética

A heterozigosidade genética total (H_T) de todas as populações, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi de 0,345 ($\pm 0,017$) e a heterozigosidade média dentro da população (H_S) foi de 0,253 ($\pm 0,007$). O coeficiente de diferenciação populacional (G_{ST}) (NEI, 1978) encontrado foi 0,267, com fluxo gênico histórico (N_m) entre as populações de 1,37 migrantes por geração. A diversidade genética (NEI, 1973) e o índice de Shannon para a espécie foram, respectivamente, 0,364 e 0,541.

As populações localizadas nos municípios de Santo Hipólito (SAH), Januária (JAN), Montalvânia (MON) apresentaram os maiores índices de diversidade genética (Tabela 3, Figura 5). As porcentagens de locos

polimórficos nessas populações foram respectivamente: 90,53%, 86,32%, 84,21%. As populações B JL, MIN, ARC e NOR apresentaram baixos índices de diversidade genética, em comparação com as demais populações, destacando as populações de Bom Jesus da Lapa (BJL) e Mindurí (MIN), que apresentaram baixo He (0,101 e 0,143, respectivamente) e baixa porcentagem de locos polimórficos (24,21% e 26,32%, respectivamente). Nestas localidades foram encontrados poucos indivíduos de *C. pubiflora*.

Tabela 3 Estimativas de diversidade genética em 10 populações de *Ceiba pubiflora*. N: número de indivíduos, He: diversidade genética de Nei (1978), *I*: índice de Shannon, % P: porcentagem de locos polimórficos.

População	N	He	<i>I</i>	Nº locos polimórficos	% PL
BJL	03	0,101 (0.178)	0,146 (0.260)	23	24,21
MON	11	0,325 (0.177)	0,478 (0.243)	80	84,21
JAN	16	0,338 (0.166)	0,496 (0.227)	82	86,32
NOR	10	0,235 (0.202)	0,349 (0.288)	60	63,16
VIP	19	0,271 (0.184)	0,406 (0.257)	74	77,89
SAH	16	0,348 (0.155)	0,512 (0.207)	86	90,53
MAT	13	0,298 (0.182)	0,444 (0.247)	80	84,21
ARC	03	0,246 (0.217)	0,356 (0.307)	56	58,95
DOR	03	0,257 (0.214)	0,373 (0.303)	59	62,11
MIN	05	0,143 (0.198)	0,210 (0.289)	25	26,32
Total	101			94	97,89

() : desvio padrão. NOR: Nova Roma, ARC: Arcos, DOR: Doresópolis, B JL: Bom Jesus da Lapa, SAH: Santo Hipólito, MAT: Matozinhos, JAN: Januária, VIP: Vila Propício, MIN: Minduri, MON: Montalvânia.

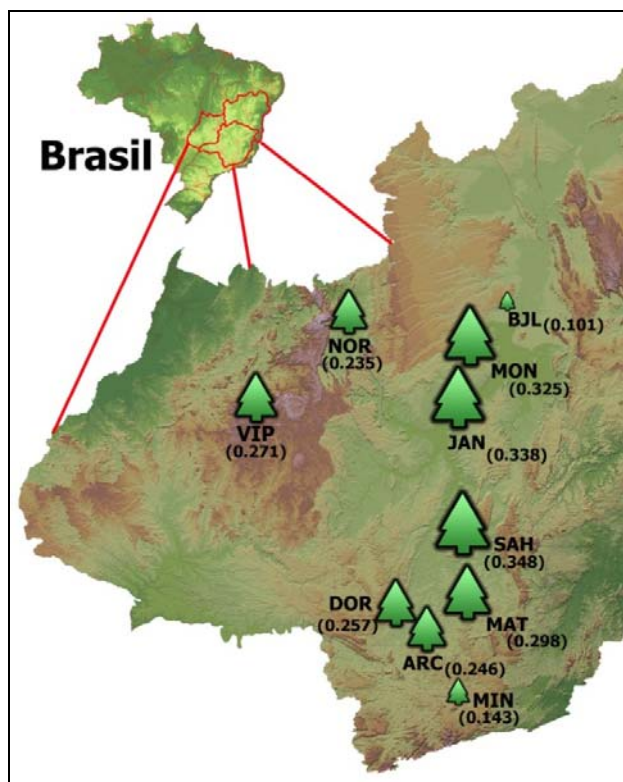


Figura 5 Representação da diversidade genética de Nei (H_e , valores entre parênteses) em 10 populações de *Ceiba pubiflora*. O tamanho do símbolo é proporcional ao valor de H_e . Ver Tabela 3. Imagem: Ministério da Agricultura.

O fluxo gênico histórico, obtido pelo cálculo indireto (MCDERMOTT; MCDONALD, 1993) Bayesiano entre os pares de populações, revelou um maior fluxo ocorrendo nas populações SAH, BJA, DOR, MIN e JAN (Figura 6). As populações SAH e BJA se destacam, pois juntas, participaram com mais de 1/4 do fluxo gênico entre todas as populações. O teste de Mantel mostrou que não existe correlação significativa entre as matrizes de fluxo gênico (N_m) e de distância geográfica, entre os pares de populações ($r = -0,08$; $p = 0,57$). As

populações NOR e VIP apresentaram os menores valores de fluxo gênico com as demais populações.

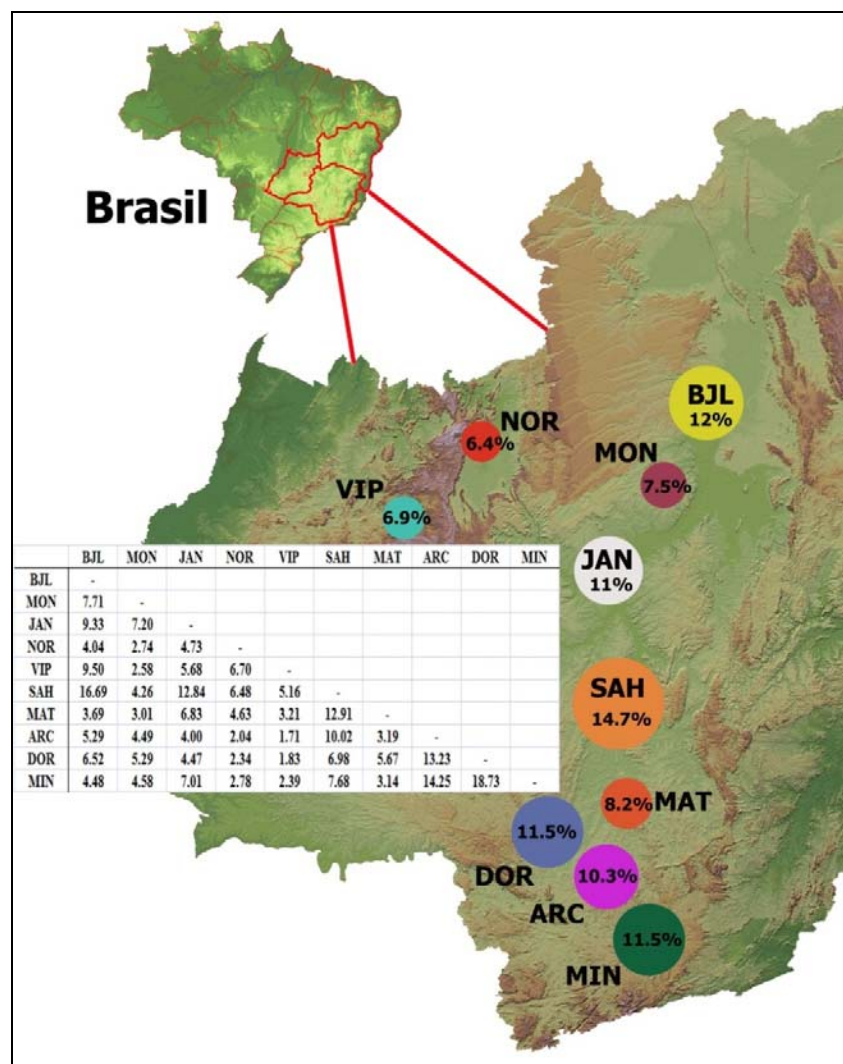


Figura 6 Distribuição da porcentagem de contribuição do fluxo gênico histórico entre populações de *Ceiba pubiflora*. Os círculos são proporcionais à porcentagem de contribuição do Nm. Ao lado, matriz dos valores de fluxo gênico entre todos os pares de populações. Imagem: Ministério da Agricultura.

3.3 Estrutura Genética

Pela análise de variância molecular (AMOVA) observa-se uma maior proporção da variabilidade genética ocorrendo entre indivíduos dentro das populações (91,51%) do que entre as populações (Tabela 4). A AMOVA revelou baixa diferenciação genética entre as 10 populações de *C. pubiflora*. Da diversidade genética total, 8,49% da variação ocorreu entre as populações ($\Phi_{ST}=0,084$, $p<0,0001$).

Tabela 4 Análise de variância molecular (AMOVA) em populações de *Ceiba pubiflora*. GL: graus de liberdade e SQ: soma do quadrado dos desvios. F_{ST} : valor de diferenciação genética.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Varição Total (%)	<i>P</i>
Entre populações	9	207,247	1,227	8,49	< 0,0001
Dentro de populações	87	978,693	13,225	91,51	< 0,0001
Total	96	1185,94	14,452	100	
F_{ST}	0,084				

Na abordagem Bayesiana, foi utilizado o modelo completo (*full model*) por apresentar o menor valor de DIC (2832,78) (Tabela 5). A heterozigosidade genética total ($H_{T-B}=0,391$) e heterozigosidade média dentro da população ($H_{S-B}=0,357$), calculadas pelo método Bayesiano, foram próximas as encontradas pelo cálculo de Nei (0,345 e 0,253 respectivamente), no entanto, o coeficiente de diferenciação populacional foi menor ($G_{ST-B}=0,087$) que o encontrado pelo cálculo de Nei (0,267).

Tabela 5 Modelos de estimação para a distância genética θ_B , testados pela análise Bayesiana entre 10 populações de *Ceiba pubiflora*. Parâmetros de diversidade θ^B e f , SD: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; DIC: *Deviance information criterion*.

Modelo	θ^B			F			DIC
	Média	SD	IC (97.5%)	Média	SD	IC (97.5%)	
Full	0,09	0,01	(0,07; 0,12)	0,71	0,23	(0,15; 0,99)	2832
$f=0$	0,06	0,01	(0,05; 0,08)	–	–	–	2874
$\theta^B=0$	–	–	–	0,75	0,12	(0,49; 0,96)	3229
Free f	0,12	0,01	(0,09; 0,15)	0,50	0,28	(0,02; 0,97)	2962

A partir do modelo completo, estimaram-se as distâncias genéticas θ^B entre os pares de populações (Tabela 6) pela análise Bayesiana. As populações de MIN e DOR apresentaram o menor valor de distância genética entre elas (0,026), e as populações de ARC e VIP apresentaram o maior valor (0,241). O valor médio de θ^B de todas as combinações foi de 0,1, com distância geográfica média de aproximadamente 490 km. O teste de Mantel revelou a existência de correlação positiva e significativa ($r=0,428$; $p=0,008$) entre as distâncias genética e geográfica entre as populações.

Tabela 6 Distância genética θ_B (abaixo da diagonal) e distância geográfica (Km) entre os pares de populações de *Ceiba pubiflora* (acima da diagonal).

	NOR	ARC	DOR	BJL	SAH	MAT	JAN	VIP	MIN	MON
NOR	0	738,25	732,12	376,87	578,59	712,83	333,97	288,66	908,39	280,63
ARC	0,194	0	81,0	811,07	262,62	175,0	558,38	641,84	178,51	662,71
DOR	0,172	0,037	0	822,07	283,64	208,46	556,93	620,7	202,43	669,92
BJL	0,112	0,083	0,069	0	561,92	701,74	266,06	638,89	938,78	165,5
SAH	0,075	0,049	0,068	0,030	0	142,52	309,29	588,49	375,82	428,05
MAT	0,100	0,139	0,083	0,122	0,038	0	451,66	686,32	238,64	570,39
JAN	0,102	0,114	0,104	0,053	0,040	0,072	0	485,82	680,18	121,14
VIP	0,072	0,241	0,221	0,051	0,096	0,138	0,089	0	817,72	497,92
MIN	0,149	0,034	0,026	0,092	0,062	0,140	0,068	0,178	0	801,38
MOM	0,160	0,101	0,086	0,063	0,106	0,145	0,068	0,172	0,100	0

O correlograma multivariado (Gráfico 2) mostra uma baixa correlação negativa e significativa na primeira classe de distância geográfica ($r=-0,3$; $p = 0,028$). Para as outras classes de distância, os valores foram maiores, porém não significativos. A interceptação do eixo X ocorreu na terceira classe de distância, entre 401 a 580 km. Esse intercepto indica a distância geográfica onde as populações podem ser consideradas como grupos geneticamente independentes, sendo considerados como Unidades Operacionais (UO).

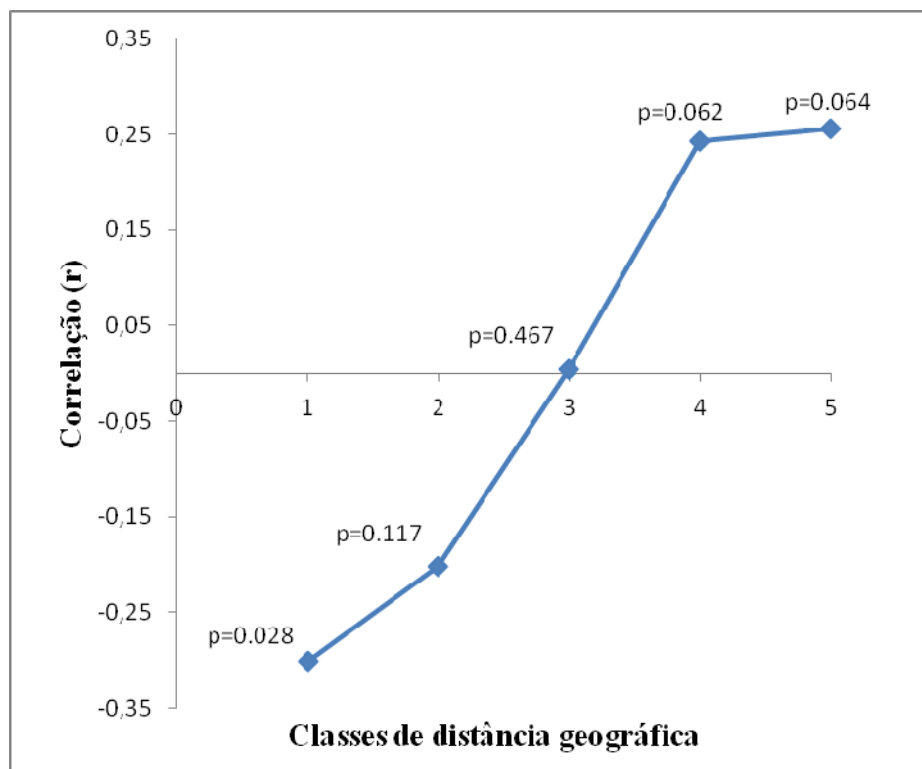


Gráfico 2 Correlação entre distância genética θ^B e cinco classes de distância geográfica (Classe 1: 0-250 km; Classe 2: 251-400 km; Classe 3: 401-580 km; Classe 4: 581-710; Classe 5: 711-) para *Ceiba pubiflora*.

A análise Bayesiana realizada no programa STRUCTURE revelou a existência de cinco grupos genéticos distintos ($K=5$), como mostra o gráfico com os valores de $\ln P(D)$ (Figura 8 – A), ou seja, os genótipos de *C. pubiflora* analisados neste trabalho pertencem a cinco grupos distintos (Figura 8 – B).

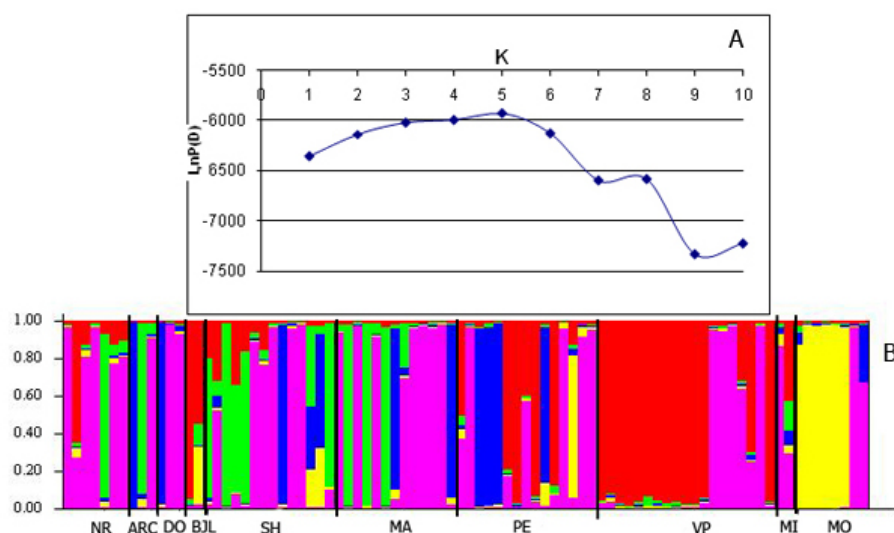


Figura 8 A – gráfico dos valores dos agrupamentos genéticos (K) e log da probabilidade média (LnP(D)), obtidos pela análise Bayesiana. Os 101 indivíduos de *Ceiba pubiflora* das 10 populações estão representados no gráfico B, dos diferentes conjuntos genéticos para $K = 5$. As populações estão delimitadas pela barra vertical escura.

O valor de K revela o número real de grupos genéticos, ou seja, o maior valor observado de LnP(D) indica uma estrutura de agrupamento das dez populações em cinco grupos, mostrado pelas cores no gráfico (Figura 8 – B). Apenas as populações VIP e MON apresentaram baixa estruturação de cores, que representam os cinco agrupamentos. Adicionalmente, a análise para verificar efeito de gargalo genético histórico (*bottleneck*) para *C. pubiflora*, mostrou excesso de locos heterozigotos, com taxa de deficiência de 89/6 ($p < 0,001$), ou seja, 89 locos em excesso e 6 em déficit. O resultado revela que a heterozigosidade esperada, dentro do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), nos locos polimórficos é maior do que a esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva.

A triangulação de *Delaunay*, para verificar descontinuidades genéticas geradas por barreiras na paisagem, indicou a existência de pelo menos três barreiras (Figura 9). A mais intensa (1) separa as populações do Estado de Minas Gerais e Bahia das populações de Goiás (Figura 9, barreira 'a'), a segunda (2) separa as populações do sul do Estado de Minas Gerais das demais populações (Figura 9, barreira 'b') e a terceira (3) separa a população VIP das demais populações (Figura 9, barreira 'c'), com base nos valores de θ^B .

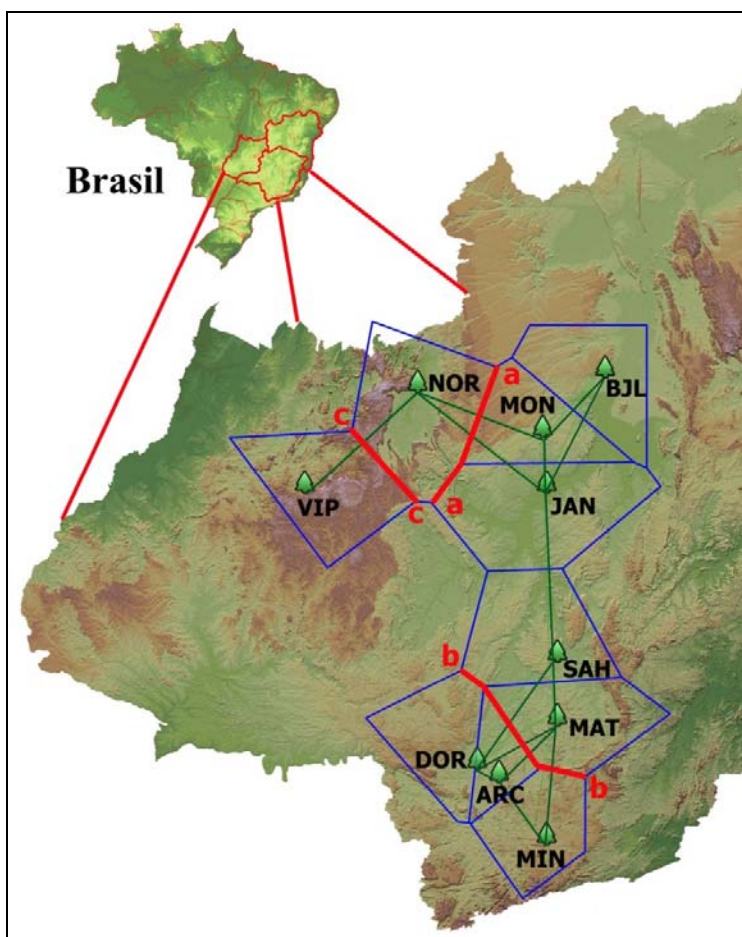


Figura 9 Mapa de relevo (Imagem: Ministério da Agricultura) das populações amostradas de *Ceiba pubiflora* e a rede de triangulação de *Delaunay* (linhas

azuis). As linhas em vermelho (a, b e c) indicam as descontinuidades genéticas entre os conjuntos de populações. Imagem: Ministério da Agricultura.

Além da própria distância geográfica, que separa naturalmente as populações amostradas, outras possíveis barreiras para o fluxo gênico entre as populações podem ser apontadas. Estas seriam: (a) Planalto Central ou vale do Rio Paranã e extensas áreas de cultivo; (b) proximidades da cadeia do Espinhaço ou vale do rio São Francisco e, mudança da fisionomia da vegetação, região ecotonal de formações de Florestas Semidecíduais do domínio Atlântico (Figura 1); (c) extensas áreas com intervenção antrópica e o Planalto Central.

O dendrograma construído pelo método UPGMA (Figura 10), utilizando a matriz das distâncias genéticas (θ^B) também mostrou que populações geograficamente próximas tendem a apresentar menor distância genética.

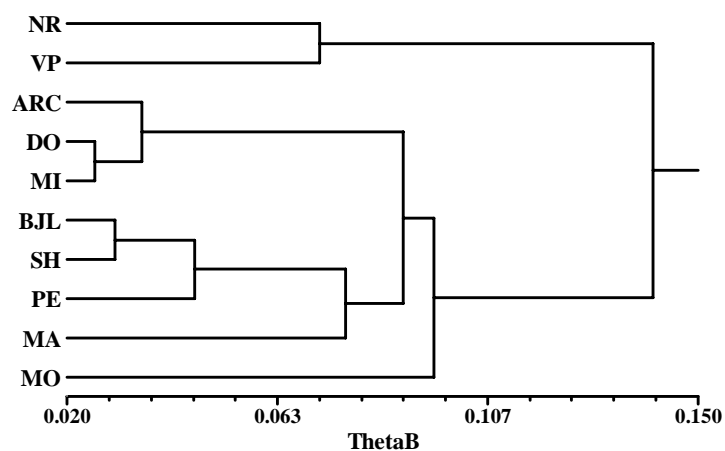


Figura 10 Dendrograma UPGMA baseado na distância genética (θ^B) entre populações de *Ceiba pubiflora*.

Pelo dendrograma nota-se a formação de dois grupos, um formado pelas populações localizadas no Estado de Goiás (NOR e VIP) e outro formado pelas demais populações. No segundo grupo, observar-se a separação de um subgrupo formado pelas populações que estão sob influência do domínio Atlântico (ARC, DOR e MIN) e estão próximas geograficamente. As populações localizadas ao norte formam outro subgrupo (BJL, SAH, JAN, MAT) que se assemelham geneticamente com o subgrupo localizado ao sul e com a população de Montalvânia (MON). A população MON se distanciou dos dois subgrupos formados. Isto corrobora com o resultado do teste de Mantel, onde houve correlação das distâncias genética e geográfica e, em parte, com o esperado pelo modelo de isolamento pela distância, proposto por Wright (1943).

4 DISCUSSÃO

Esse estudo de conservação, com uso de marcadores moleculares ISSR, mostrou a existência de alta diversidade genética dentro das populações de *Ceiba pubiflora*. Os resultados encontrados reforçam a hipótese de que as populações remanescentes desta espécie conservam variabilidade genética, importante para sua sobrevivência ao longo do tempo. Os índices de diversidade genética, estimados a partir das frequências alélicas, são importantes para subsidiar medidas eficazes de conservação.

O número de locos utilizados em estudos de diversidade genética de espécies arbóreas, com marcador molecular ISSR é variável (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011; NYBOM, 2004; SOUZA; LOVATO, 2010). O cálculo do número ótimo de bandas (SILVEIRA; RUAS; RUAS, 2003) e o valor de PIC têm sido utilizados (BHATTACHARYA; BANDOPADHYAY; GHOSH, 2010; MUTHUSAMY; KANAGARAJAN; PONNUSAMY, 2008; SALEH, 2011). Os marcadores ISSR deste estudo se mostraram eficientes, para a quantificação da diversidade genética de *C. pubiflora*, e para identificar o polimorfismo entre os indivíduos nas populações, evidenciado pelos resultados do PIC (média de 0,369), e do cálculo do número ótimo de locos (87). Dados obtidos pelos marcadores ISSR também podem ser comparados aos obtidos por RAPD, pela sua natureza dominante e parâmetros genéticos similares obtidos por ambos (NYBOM, 2004; NYBOM; BARTISH, 2000).

A espécie *C. pubiflora* apresenta altos índices de diversidade genética para a maioria das populações analisadas, exceto para as populações BJL e MIN. Os valores médios de diversidade genética encontrados para a espécie ($H_e=0,364$; $G_{ST}=0,267$) são próximos dos valores estimados para espécies de

sistema de reprodução de cruzamento ($H_{POP}=0,27$; $G_{ST}=0,22$) e de dispersão anemocórica ($H_{POP}=0,27$) (NYBOM, 2004).

A porcentagem de locos polimórficos é um parâmetro utilizado em estudos de conservação genética de populações, obtidos a partir de marcadores dominantes (ALEXANDER; LISTON; POPOVICH, 2004; BRANDÃO et al., 2011; COTA et al., 2011; GE; SUN, 2001; OLIVEIRA et al., 2012; XIA et al., 2007). Observou-se que metade das populações estudadas apresenta porcentagem de locos polimórficos abaixo de 70% (NOR, ARC, DOR, BJL e MIN), sendo que as populações de BJL e MIN apresentaram valores muito baixos de diversidade genética ($H_e=0,101$ e $0,143$; %PL=24,21 e 26,32, respectivamente). Estes baixos valores podem ser devidos ao baixo número de indivíduos encontrados nessas áreas, pois foram encontrados somente 3 e 5 indivíduos, respectivamente (baixa tamanho populacional). Outros resultados, com marcadores dominantes, mostram resultados similares para locos polimórficos. Lacerda et al. (2001) encontraram 71% de locos polimórficos para *Plathymenia reticulata* e, para *P. foliolosa*, encontraram 64,9% (LACERDA et al., 2002).

Populações com tamanho demográfico baixo e que permanecerem isoladas por muitas gerações, podem estar sujeitas a duas consequências genéticas importantes: altos níveis de deriva genética e endogamia. Isto contribui efetivamente para a ocorrência de baixa diversidade genética dentro dessas populações e, para a deriva, em que alelos de baixa frequência tendem a ser perdidos na população (BARRETT; KOHN, 1991; ELLSTRAND; ELAM, 1993).

Em Florestas Estacionais Deciduais a ocorrência da espécie *Ceiba pubiflora* está associada a afloramentos de calcário (GIBBS; SEMIR, 2003). Esses afloramentos, muitas vezes, possuem limites para o estabelecimento da espécie, levando a uma baixa densidade populacional. Em Florestas Estacionais

Semidecíduais (por exemplo, MIN), a espécie *C. pubiflora* é de ocorrência rara, ou seja, a densidade populacional também é baixa, com indivíduos separados por distâncias maiores, em comparação com aqueles que ocorrem em afloramentos de calcário. Portanto, a baixa densidade populacional e isolamento dos indivíduos podem ser fatores críticos para os baixos índices de diversidade nessas populações. Dados similares de diversidade genética foram encontrados para espécies ameaçadas de baixa densidade populacional, como a *Dimorphandra wilsonii* ($P_{LP}=40\%$; $I=0.190$; $He=0.124$) (SOUZA; LOVATO, 2010), *Heptacodium miconioides*, espécie ameaçada e endêmica da China ($P_{LP}=78.3\%$, $I=0.3760$; $He=0.246$) (JIN; LI, 2007).

Outro fator importante que deve ser considerado é a alta taxa de fragmentação florestal, principalmente nas adjacências dos locais estudados. Nos últimos dois séculos, a região central do Brasil teve grande expansão urbana e agrária. Grandes áreas cultivadas, em destaque no sul do Estado de Minas Gerais e Estado de Goiás, intensificam o efeito de isolamento das populações sobre os afloramentos calcários, e conseqüentemente das populações de *C. pubiflora* que ocorrem em Florestas Semidecíduais.

Alguns autores (JUMP; PEÑUELAS, 2006; LOWE et al., 2005; ORTEGO; BONAL; MUÑOZ, 2010; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996) argumentam que a fragmentação, ou mesmo a perda de habitat, pode levar a uma erosão da variabilidade genética. Isso ocorre devido a modificações nos sistemas de cruzamentos das plantas, ocasionando endogamia e diminuição na taxa de fluxo gênico, que por sua vez leva ao aumento da diferenciação das populações. Em ambientes perturbados, pode ocorrer perda da variabilidade genética e do *fitness* da espécie, aumentando o risco de extinções de populações locais em curto prazo e, em longo prazo, limitação no potencial evolutivo da espécie frente às mudanças climáticas/ambientais (BARRETT; KOHN, 1991; HAMRICK,

2004; HELDRICK; MILLER, 1992; JUMP; PEÑUELAS, 2006; TANSLEY; BROWN, 2000; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996).

Esses argumentos citados anteriormente são questionados para espécies arbóreas de vida longa (JUMP; PEÑUELAS, 2006), dependendo muitas vezes das interações com seus agentes dispersores de pólen e sementes, e da estratégia de colonização da espécie. Espécies arbóreas podem ser mais resistentes aos efeitos da fragmentação do que se supõem (HAMRICK, 2004; JUMP; PEÑUELAS, 2006). No trabalho de Kramer et al. (2008) são discutidas algumas contradições quanto aos efeitos genéticos da fragmentação florestal, uma vez que são escassos suportes empíricos para esta teoria. Os autores reforçam a ideia de que, na realidade ecológica, muitas vezes os limites dos fragmentos florestais não representam efetivamente os limites para populações de espécies arbóreas de fecundação cruzada. Sendo assim, espécies arbóreas em florestas tropicais evoluíram num contexto de poucos indivíduos por área, separados por grandes distâncias entre eles, onde o sistema de polinização necessariamente contorna esse fator.

Por outro lado, espécies de ocorrência rara, como a *Ceiba pubiflora*, podem ser mais propensas aos efeitos da fragmentação florestal, sobretudo pela perda de indivíduos, aliada à perda de habitat, e impactos sobre seu agente polinizador. Como apontando por Souza e Lovato (2010), populações com baixa densidade populacional estariam mais ameaçadas pelo seu próprio *status* demográfico que pela baixa diversidade genética em sua população.

O tamanho da população (N) também pode explicar os altos índices de diversidade genética observados nas populações SAH, JAN e MON. Nessas populações é encontrada maior densidade de indivíduos sobre o afloramento, e são áreas em melhor estado de conservação, sendo que a população JAN está inserida em uma reserva ecológica (Parque Estadual Veredas do Peruaçu). Entretanto, a maioria dessas populações está sob forte pressão antrópica, sendo o

seu entorno destruído aos poucos, principalmente pelo corte ilegal de madeira para produção de carvão vegetal e abertura de áreas para pecuária. Além disso, existe a possibilidade de exploração de calcário nesses remanescentes, devido à crescente demanda exigida pela expansão urbana. Impactos que alteram os sítios de ocorrência da espécie e/ou o comportamento dos agentes polinizadores de *C. pubiflora* podem gerar perda de diversidade genética nas populações, como discutido anteriormente.

Ceiba pubiflora tem uma efetiva polinização realizada por beija-flores e, em menor eficiência por borboletas e morcegos (GIBBS; SEMIR, 2003) e as sementes são dispersas pelo vento. A abundante produção de sementes, que são leves e pilosas, capazes de percorrer grandes distâncias carregadas pelo vento, somada à capacidade do beija-flor em percorrer a distância que separa uma árvore da outra, durante o forrageamento, possibilita uma maior recombinação de alelos dentro da população e entre elas. Os níveis de fluxo gênico e baixa diferenciação entre populações são indicativos de recombinação de alelos.

O fluxo gênico (Nm) é primordial para a homogeneização dos alelos entre as populações (HARTL; CLARK, 1997). Os valores de fluxo gênico são baseados nos relatados por Mills e Allendorf (1996) e Wang (2004), cujo número de 1,0 a 10 migrantes por geração, entre as populações, contrapõe os efeitos da deriva genética. Já segundo Wright (1951) e Slatkin (1987), valores de Nm superiores a 4,0 migrantes por geração pode evitar os efeitos do cruzamento de indivíduos aparentados, que eventualmente ocorrem dentro das populações. Apesar da distância geográfica que separa algumas populações (média de 490 km), historicamente o fluxo gênico ocorreu entre elas, com dois migrantes por geração ($Nm=2,62$). A dispersão de sementes anemocórica de *C. pubiflora* possibilita o aporte de alelos de uma população para outra, aliado ao fato que o agente polinizador (beija-flor e, possivelmente morcego) consegue visitar várias matrizes, a longas distâncias, em busca de recurso, levando os alelos via pólen.

A dinâmica do fluxo gênico entre as populações estudadas mostrou um maior fluxo na região Sul amostrada e vale do rio São Francisco (ver Figura 6). Possivelmente as populações ao Sul (DOR, ARC, MIN) e as populações SAH e B JL funcionam como fonte de fluxo gênico. Nas áreas onde se localizam as populações MAT e DOR ocorre uma série de afloramentos calcários que provavelmente funcionam como vias para o fluxo gênico histórico. Essas vias de colonização também podem explicar o fluxo entre populações distantes (como por exemplo, NOR, SAH, MIN). Portanto, cada afloramento calcário interligou as populações ao longo das gerações pelo fluxo gênico.

A população MIN, localizada em Floresta Estacional Semidecidual e não sobre afloramento de calcário, provavelmente sofre diferentes pressões de seleção do ambiente, em comparação às populações sobre afloramento. A seleção natural favorece ao padrão de fluxo de alelos dentro da população que maximiza o *fitness*, evitando depressão endogâmica e exogâmica (BEGON; COLIN; HARPER, 2006). Essa última ocorre pela dispersão por longas distâncias, que pode reunir genótipos adaptados a diferentes situações pontuais e, seu cruzamento com a população receptora pode gerar indivíduos de baixo *fitness* (WASER; PRICE, 1994). Em uma visão geral, as populações que estão mais próximas apresentaram maior troca de alelos. Provavelmente favorecidas pela dispersão das sementes pelo vento. As populações de VIP, NOR e MON podem estar funcionando como populações receptoras, uma vez que foram as que menos contribuíram para a dinâmica do fluxo gênico entre as populações. Por outro lado, essas populações são devem ser conservadas, pois são importantes para manutenção da diversidade genética *in situ* e homogeneização dos alelos, pelo fluxo gênico. Populações que funcionam como fontes receptoras ou escoadouros de fluxo gênico são discutidas em Howes et al. (2009).

A dinâmica do fluxo gênico entre as populações indica que a Bacia do Rio São Francisco seria uma possível rota de migração da espécie *Ceiba*

pubiflora. Esse resultado é um indício que essa região seja um local de refúgio da espécie na última glaciação (18.000-12.000 anos atrás) e, que a colonização de outras áreas foi iniciada a partir deste local. Acredita-se que as Florestas Estacionais Deciduais (FEDs) são remanescentes que no período seco e frio do Pleistoceno se expandiram, enquanto as florestas úmidas retraíram para áreas menos secas. Com aumento da umidade, as FEDs se retraíram, dando lugar às florestas úmidas, sendo que as florestas sobre afloramento calcário mantiveram condições edáficas favoráveis para as FEDs (PENNINGTON et al., 2004; PRADO, 2000; PRADO; GIBBS, 1993; SANTOS et al., 2012).

A análise de *bottleneck* mostra que as populações de *C. pubiflora* sofreram diminuição do seu tamanho efetivo por algumas gerações passadas, o que leva essas populações a apresentarem um excesso temporário de heterozigosidade (LUIKART et al., 1998). Dados de filogeografia, obtidos por análise de sequenciamento do cpDNA dessas populações, podem confirmar a hipótese que são populações refugiadas desse período, assim como outros trabalhos com espécies restritas à afloramento calcário, como por exemplo *Ficus bonijesulapensis* (VIEIRA et al.; DUARTE, et al., dados não publicados).

Caso as populações apresentem fluxo gênico superior a pelo menos um migrante por geração, não ocorre diferenciação genética entre elas. Os resultados deste estudo mostraram baixa diferenciação genética entre populações, confirmada pelas análises de variância molecular (AMOVA, com F_{ST} de 0.084) e Bayesiana (θ^B de 0.096). A maioria das espécies perenes e de fecundação cruzadas apresentam maior valor de diversidade dentro das populações (NYBOM; BARTISH, 2000). Esses resultados são pertinentes aos observados em outras espécies de fecundação cruzada e de vida longa (APTE et al., 2006; COTA et al., 2011; LOVELESS; HAMRICK, 1984; NYBOM, 2004; OLIVEIRA et al., 2012; WHITE et al., 1999). Além disso, espécies que ocorrem em afloramento de calcário se desenvolvem em condições ambientais

específicas, oriundas de uma seleção de genótipos adaptados para essas condições. Isto também explicaria a baixa diferenciação populacional encontrada, uma vez que populações submetidas a condições ambientais semelhantes levariam a uma seleção de genótipos semelhantes (VIA et al., 1995).

A homogeneização dos alelos, proporcionada pelo fluxo gênico, e o efeito fundador que acentua a estruturação dentro da população, poderiam explicar o padrão de estruturação verificado pela análise Bayesiana (Figura 8). Os genótipos das 10 populações foram distribuídos em pelo menos cinco subgrupos. As populações SAH, MAT, JAN, VIP e MON apresentaram uma menor estruturação genética comparadas às outras populações. Estas populações contêm alelos com maior frequência, mas não exclusivos, indicando uma conexão antiga entre as populações, proporcionada pelo fluxo gênico.

Para *C. pubiflora*, o correlograma multivariado (Gráfico 2) indicou que a partir de 400 Km, todas as populações que estão abaixo desse valor são geneticamente semelhantes, ou seja uma mesma Unidade Operacional (UO). Esta distância é importante para estabelecer estratégias de amostragem, visando à conservação genética e manejo da variabilidade genética da espécie *C. pubiflora* (DINIZ-FILHO; TELLES, 2002; SOARES et al., 2008; TELLES et al., 2003). Para maximizar a amostragem da diversidade genética de *C. pubiflora*, a indicação de UO para o manejo, ou áreas para coleta de sementes, as populações devem estar distanciadas a 400 km. Por exemplo, as populações SAH, MON e VIP podem ser apontadas como Unidades Operacionais para *Ceiba pubiflora*, bem como uma população encontrada no sul de Minas Gerais (por exemplo, MIN), como proposto em Diniz-Filho e Telles (2002).

Em estudos de genética da paisagem, busca-se avaliar as discontinuidades genéticas que ocorrem entre as populações e as possíveis barreiras na paisagem (MANEL et al., 2003). Para a genética da conservação,

detectar essas barreiras é importante para se estabelecer áreas prioritárias para conservação *in situ* ou para coleta de sementes. As possíveis barreiras ao fluxo gênico encontradas para *C. pubiflora* são depressão da bacia hidrográfica do rio São Francisco, o Planalto Central, vale do Paranã e fisionomias distintas para algumas populações, que podem selecionar genótipos mais semelhantes como em DON, ARC e MIN, agrupando essas populações pelo método de UPGMA (Figuras 1, 9 e 10). Essas populações apresentaram altas taxas de fluxo gênico entre elas. Nas áreas de estudo, além das barreiras naturais e da distância geográfica que separam os remanescentes florestais, são observadas extensas áreas cultivadas e aglomerados urbanos. Estes fatores somados aos danos causados pela exploração florestal e extração de calcário, colocam em risco as populações naturais de *C. pubiflora* e as interações ecológicas nesses ambientes peculiares.

5 IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO

Os afloramentos de calcário são áreas que estão sobre constante pressão antrópica. A retirada de pedras calcárias para produção de cimento leva à perda de um habitat único, que comporta espécies importantes ecologicamente. Áreas como MA, SH e MO devem ser prioritárias para conservação, em vista dos altos índices de diversidade encontrados nessas áreas, além do fato de estarem sobre áreas de intensa atividade de desmatamento e extração de calcário. Por outro lado, populações que estão em áreas ecotonais (por exemplo, ARC, MIN, NOR) também devem ser conservadas, uma vez que preservam indivíduos com características adaptativas para essas áreas (SMITH et al., 2001), e sofrem historicamente pela exploração humana.

Objetivando a conservação genética da espécie *Ceiba pubiflora*, Unidades Operacionais (UO) de conservação devem ser criadas. Na região do sul do estado de Minas Gerais, UO deve ser criada para preservar indivíduos adaptados à transição para florestas mais úmidas (por exemplo, MIN), assim como uma UO na região noroeste do estado de Goiás, na transição do Planalto Central (por exemplo, VIP). Outra unidade na região central do estado de Minas Gerais, uma vez que essas populações apresentam alta diversidade genética e intensa atividade de fluxo gênico entre as demais (por exemplo, SAH). Uma UO na região mais ao norte de Minas Gerais e sul da Bahia (por exemplo, MON), por ser uma área ecotonal com a Caatinga Arbórea, fisionomia em risco pela degradação e que é apontada como uma extensão da Mata Atlântica (OLIVEIRA-FILHO; JARENKOW; RODAL, 2006; SANTOS et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. 3. ed. São Paulo: Ateliê, 2003. 159 p.
- AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, Dec. 2008.
- ALEXANDER, J. A.; LISTON, A.; POPOVICH, S. J. Genetic diversity of the narrow endemic astragalus oniciformis (Fabaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 12, p. 2004-2012, Dec. 2004.
- APTE, G. S. et al. Genetic diversity analysis in *Gaultheria fragrantissima* Wall. (Ericaceae) from the two biodiversity hotspots in India using ISSR markers. **Current Science**, Bangalore, v. 91, n. 12, p. 1634-1640, Dec. 2006.
- BALKENHOL, N.; WAITS, L. P.; DEZZANI, R. Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. **Ecography**, Copenhagen, v. 32, n. 5, p. 818-830, Oct. 2009.
- BARRETT, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (Ed.). **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University, 1991. p. 3-30.
- BATISTINI, A. P. et al. Genetic diversity of natural population of *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae) in the Cerrado of São Paulo State, Brasil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 52-63, Jan. 2009.
- BEARD, J. S. Climax vegetation in tropical America. **Ecology**, Durham, v. 25, p. 127-158, 1944.
- _____. The classification of tropical American vegetation-types. **Ecology**, Durham, v. 36, p. 89-100, 1955.
- BEGON, M.; COLIN, A. T.; HARPER, J. L. **Ecology: from individuals to ecosystems**. 4th ed. New York: Blackwell, 2006. 751 p.

BHATTACHARYA, S.; BANDOPADHYAY, T. K.; GHOSH, P. D. Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessment of molecular diversity in elite germplasms of *Cymbopogon winterianus* across West Bengal, India. **Emirates Journal of Food Agriculture**, Abu Dhabi, v. 22, n. 1, p. 13-24, 2010.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Fine-scale genetic structure of *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 957-964, maio 2011.

CHAKRABORTY, R.; FUERST, P. A.; FERRELL, R. E. Potential information in family studies of linkage. In: SING, C. F.; SKOLNICK, M. (Ed.). **Genetic analysis of common diseases: applications to predictive factors in coronary disease**. New York: A. R. Liss, 1979. p. 297-303.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Austin, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, Dec. 1997.

COTA, L. G. et al. Genetic diversity of *Annona crassiflora* (Annonaceae) in northern Minas Gerais State. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 2172-2180, Sept. 2011.

CRUZ, C. D. **Programa GENES versão Windows**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 642 p.

CULLEY, T. M.; WOLFE, A. D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, Washington, v. 86, p. 545-556, 2001.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, Boston, v. 16, n. 4, p. 924-935, Aug. 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, Feb. 1990.

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

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**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

FELFILI, J. M. et al. Floristic composition and community structure of a seasonally deciduous forest on limestone outcrops in Central Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 611-621, jul./ago. 2007.

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

_____. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 2061-2069, Dec. 1999.

GIBBS, P.; SEMIR, J. Revisión taxonomica del genero *Ceiba* Mill. (Bombacaceae). **Anales del Jardín Botánico**, Madrid, v. 60, n. 2, p. 259-300, 2003.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 7, p. 998-1006, July 1994.

HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, n. 1/3, p. 323-335, 2004.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 542 p.

HELDRIK, P. W.; MILLER, P. S. Conservation genetics: techniques and fundamentals. **Journal of Ecology Applied**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 30-46, Apr. 1992.

HOLSINGER, K. E.; LEWIS, P. O. **Hickory**: a package for analysis of population genetic data. Version 1.0. Storrs: The University of Connecticut, 2007. Software.

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

HOWES, B. J. et al. Directional gene flow patterns in disjunct populations of the black ratsnake (*Pantheropsis obsoletus*) and the Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*). **Conservation Genetics**, Berlin, v. 10, n. 2, p. 407-417, May 2009.

JIN, Z.; LI, J. Genetic differentiation in endangered *Heptacodium miconioides* Rehd. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 245, n. 1, p. 130-136, Jan. 2007.

JUMP, A. S.; PEÑUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, v. 103, n. 21, p. 8096-8100, May 2006.

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

KRAMER, A.T. et al. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, Boston, v. 22, n. 4, p. 878-885, Aug. 2008.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, p. 1-27, 1964.

LACERDA, D. R. et al. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymania reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 10, n. 5, p. 1143-1152, May 2001.

_____. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymania foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 235, n. 1, p. 67-77, Jan. 2002.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. Amsterdam: Elsevier, 1998. 853 p.

- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, Nov. 1984.
- LOWE, A. J. et al. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation: reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, Washington, v. 95, p. 255-273, Aug. 2005.
- LUIKART, G. et al. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, Cary, v. 89, n. 3, p. 238-247, May/June 1998.
- MANEL, S. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 189-197, Apr. 2003.
- MANNI, F.; GUÉRARD, E.; HEYER, E. **Barrier**: a software to compute geographic barriers from a distance matrix version 2.2. Disponível em: <<http://www.mnhn.fr/mnhn/ecoanthropologie/software/barrier.html>>. Acesso em: 10 nov. 2010.
- MCCUNE, B.; MEFFORD, M. J. **Multivariate analysis of ecological data**. Version 3.0. Gleneden Beach: MjM Software, 1997. Software.
- MCDERMOTT, J. M.; MCDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 353-373, 1993.
- MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. **Conservation Biology**, Essex, v. 10, n. 6, p. 1509-1518, Dec. 1996.
- MOONEY, H. A.; BULLOCK, S. H.; MEDINA, E. Introduction. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (Ed.). **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge: Cambridge University, 1995. p. 1-8.
- MURPHY, P. G.; LUGO, A. E. Ecology of tropical dry forest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 17, p. 67-88, 1986.
- MUTHUSAMY, S.; KANAGARAJAN, S.; PONNUSAMY, S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. **Electronic Journal of Biotechnology**, Santiago, v. 11, n. 3, p. 1-10, July 2008.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Madison, v. 89, n. 3, p. 586-590, 1978.

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

NEI, M.; ROYCHOUDHURY, A. K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. **Genetics**, Austin, v. 76, p. 379-390, 1974.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Dordrecht, 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**, Zurich, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

OLIVEIRA, D. A. et al. Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 531-538, Mar. 2012.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; JARENKOW, J. A.; RODAL, M. J. N. Floristic relationships of seasonally dry forests of eastern South America based on tree species distribution patterns. In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. (Ed.). **Neotropical savannas and dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation**. Oxford: Taylor & Francis, 2006. p. 59-192.

ORTEGO, J. N.; BONAL, R. L.; MUÑOZ, A. Genetic consequences of habitat fragmentation in long-lived tree species: the case of the Mediterranean holm oak (*Quercus ilex*, L.). **Jornal of Heredity**, Cary, v. 101, n. 6, p. 717-726, Dec. 2010.

PENNINGTON, R. T. et al. Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, v. 359, n. 1443, p. 515-538, Mar. 2004.

PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of Neotropical savannas and seasonally dry forests. In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. (Ed.). **Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography and conservation**. Boca Raton: CRC, 2006. p. 1-29.

PÉREZ-GARCÍA, E. A.; MEAVE, J. A. Coexistence and divergence of tropical dry forests and savannas in southern Mexico. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 438-447, Feb. 2006.

_____. Heterogeneity of xerophytic vegetation of limestone outcrops in a tropical deciduous forest region in southern Mexico. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 175, n. 1, p. 147-163, Feb. 2005.

POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 579-586, out./dez. 2007.

PRADO, D. E. Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 57, n. 3, p. 437-461, June 2000.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South-America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 80, n. 4, p. 902-927, Aug. 1993.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, n. 4, p. 945-959, June 2000.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Structure software version 2.3**. Disponível em: <<http://pritch.bsb.uchicago.edu>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.11**. New York: Applied Biostatistic, 2000. 142 p.

ROLDAN-RUIZ, I. et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 125-134, Feb. 2000.

- SALEH, B. Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessing genetic variation in *Arthrocnemum macrostachyum* (Chenopodiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 5, p. 859-866, Sept. 2011.
- SANTOS, R. M. et al. Identity and relationships of the Arboreal Caatinga among other floristic units of seasonally dry tropical forests (SDTFs) of north-eastern and Central Brazil. **Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 409-428, Feb. 2012.
- SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F. Assessment of genetic variability within and among coffee progênies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 329-336, May 2003.
- SLATKIN, M. The average number of sites separating DNA sequences drawn from a subdivided population. **Theoretical Populations Biology**, London, v. 32, n. 1, p. 42-49, Feb. 1987.
- SMITH, T. B. et al. Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 8, p. 431, Aug. 2001.
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.
- SOARES, T. N. et al. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, Dordrecht, v. 132, n. 1, p. 9-19, Jan. 2008.
- SOUZA, H. A. V. E.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 49-56, Feb. 2010.
- SPIEGELHALTER, D. J. et al. Bayesian measures of model complexity and fit. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B**, London, v. 64, n. 4, p. 583-640, Oct. 2002.
- STORFER, A. et al. Putting the “landscape” in landscape genetics. **Heredity**, Washington, v. 98, n. 1, p. 128-142. Jan. 2007.

TANSLEY, S. A.; BROWN, C. R. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation. **Biological Conservation**, Essex, v. 95, n. 1, p. 39-48, Jan. 2000.

TAYLOR, B. L.; DIZON, A. E. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 11-18, Jan. 1999.

TELLES, M. P. C. et al. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC ('cagaiteira'-Myrtaceae) in central Brazil: implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, Berlin, v. 4, n. 6, p. 685-695, July 2003.

_____. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. **Biological Conservation**, Essex, v. 139, n. 1, p. 37-46, Jan. 2007.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2001. 124 p.

VIA, S. et al. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 19, n. 5, p. 212-217, May 1995.

WANG, J. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. **Conservation Biology**, Essex, v. 18, n. 2, p. 332-343, Apr. 2004.

WASER, N. M.; PRICE, M. V. Crossing distance effects in *Delphinium nelsonii*: outbreeding and inbreeding depression in progeny fitness. **Evolution**, Lancaster, v. 48, n. 3, p. 842-852, June 1994.

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

WHITE, G. M.; BOSCHER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 1899-1909, Nov. 1999.

WRIGHT, S. Genetical structure of population. **Annals of Eugenics**, New York, v. 15, p. 395-420, 1951.

_____. Isolation by distance. **Genetics**, Austin, v. 28, p. 114-138, 1943.

XIA, T. et al. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 209-214, Apr. 2007.

YEH, F. C. et al. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology centre**. Edmonton: University of Alberta, 1997. 143 p.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 413-418, Oct. 1996.

ZIETKIEWICZ, 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, Apr. 1994.

ARTIGO II

SELEÇÃO DE *PRIMERS* cpDNA E INFERÊNCIAS FILOGEOGRÁFICAS DE *Ceiba pubiflora* (MALVACEAE) EM AFLORENTOS DE ROCHAS CARBONÁTICAS

RESUMO

Os fragmentos de Floresta Estacional Decidual (FED) sobre afloramento de calcário estão constantemente ameaçados pela retirada de madeira, para produção de carvão e exploração de calcário, para indústria de cimento. Esses fragmentos de FEDs podem representar remanescentes de um contínuo de floresta, no período seco do Pleistoceno, abrigando hoje espécies endêmicas e importante diversidade genética, que devem ser preservadas. A espécie arbórea *Ceiba pubiflora* (Malvaceae) apresenta distribuição descontínua, ocorrendo principalmente em afloramentos calcários no Brasil central, em FEDs. A polinização é realizada principalmente por beija-flores. As sementes são leves de dispersão anemocórica. Com este trabalho objetivou-se a seleção de *primers* cpDNA, para realização de inferências históricas filogeográficas de *C. pubiflora*, e indicar áreas que possam ser centros de diversidade da espécie, prioritárias para conservação. Treze *primers* cpDNA foram testados em 13 populações de *C. pubiflora* (83 indivíduos). Os *primers* EF, CD, HA, CY6, CS3, BF, QS2 e 20-12 apresentaram melhor desempenho na amplificação. As regiões amplificadas dos *primers* EF e CS3 foram sequenciadas, gerando quatro e nove haplótipos, respectivamente. A rede *median-joinig* revelou maior diversidade de haplótipos na bacia do rio Paranã (Goiás) e rio São Francisco na Caatinga Arbórea (norte de Minas Gerais e Bahia). Essas áreas devem ser priorizadas para conservação. Os resultados apóiam a hipótese do Arco Pleistocênico.

Palavras-chave: Floresta Estacional Decidual, DNA de cloroplasto, Sequenciamento, Conservação Genética.

ABSTRACT

The fragments of limestone outcrop on Seasonal Dry Tropical Forests (SDTFs) are constantly threatened by the removal of timber for charcoal production and exploitation of limestone for cement industry. These fragments of SDTFs may represent remnants of a continuous forest, the dry period of the Pleistocene, now harboring endemic species and important genetic diversity to be preserved. The tree species *Ceiba pubiflora* (Malvaceae) has discontinuous distribution, occurring mainly on SDTFs limestone outcrops in central Brazil. Pollination is done mainly by hummingbirds. The seeds are anemochoric dispersal. This paper aims at the selection of cpDNA primers for historical phylogeographic inferences *C. pubiflora*, and indicate areas that may be centers of specie diversity, conservation priority. Thirteen cpDNA primers were tested on 13 populations *C. pubiflora* (87 trees). The primers EF, CD, HA, CY6, CS3, BF, QS2 and 20-12 performed better amplification. The primers amplified regions of EF and CS3 were sequenced, generating four and nine haplotypes, respectively. The median-joining network revealed greater diversity of haplotypes in the Paranã river basin (Goiás) and the São Francisco river in Arboreal Caatinga (north of Minas Gerais and Bahia). These areas should be prioritized for conservation. The results support the hypothesis of Pleistocene Arch.

Keywords: Seasonal Dry Tropical Forests, Chloroplastidial DNA, DNA Sequencing, Conservation Genetic.

1 INTRODUÇÃO

As Florestas Estacionais Deciduais (FEDs) sobre afloramento de calcário estão constantemente ameaçadas pela retirada de madeira, para produção de carvão, e pela degradação do ambiente em virtude da exploração de calcário, para indústria de cimento (PENNINGTON; LEWIS; RATTER, 2006; WERNECK; FRANCESCHINELLI; TAMEIRÃO-NETO, 2000). As espécies desses locais suportam condições de stress hídrico, solos rochosos rasos e forte período de seca, podendo chegar a seis meses de estiagem (FELFILI et al., 2007).

As FEDs sobre afloramento de calcário, presentes em pequenas manchas no Brasil central, podem ser formações remanescentes de uma floresta contínua num período seco do Pleistoceno. A hipótese do Arco Pleistocênico prediz que durante a última glaciação (18.000 a 12.000 anos), uma faixa que interligava dois principais grandes centros de FEDs, a Caatinga no Nordeste Brasileiro e os Chacos na Argentina e sul da Bolívia, era coberta por extensas formações arbóreas sazonais (PRADO; GIBBS, 1993). Acredita-se que as Florestas Estacionais Deciduais podem ter expandido amplamente durante o último período glacial (PENNINGTON; PRADO; PENDRY, 2000; PRADO, 2000; PRADO; GIBBS, 1993). No período atual, os afloramentos calcários possibilitam condições edafoclimáticas favoráveis para ocorrência de FED. Esses ambientes, muitas vezes, oferecem condições para o desenvolvimento de vegetação arbórea (FELFILI, 2003; SCARIOT; SERVILHA, 2000), sendo uma delas a *Ceiba pubiflora*.

A espécie arbórea *Ceiba pubiflora* (A.St.-Hil.) K. Schum. (Malvaceae) conhecida popularmente como barrigudinha ou paineira, apresenta distribuição descontínua, ocorrendo principalmente em afloramentos calcários no Brasil

central, em Florestas Estacionais Deciduais (FEDs). É classificada por Oliveira-Filho (2006) como sendo de ocorrência rara, com distribuição desde o Mato Grosso do Sul até a Caatinga do Norte de Minas Gerais e Bahia. Grande parte do gênero *Ceiba* ocorre restritamente em florestas sazonais secas (FEDs), sendo a *C. pubiflora* de ocorrência preferencial, mas não exclusiva, em FEDs sobre afloramentos de calcário (GIBBS; SEMIR, 2003). Essa espécie apresenta tronco com intumescência e presença de acúleos também nos ramos. A polinização é realizada por beija-flores e, com menos eficiência por borboletas e morcegos (Gibbs e Semir, 2003). Os frutos são cápsulas oblongas e deiscentes, com sementes leves envolvidas por arilos pilosos (paina) para auxiliar na dispersão anemocórica.

Os principais locais de ocorrência de *C. pubiflora* apresentam características históricas e ambientais peculiares. As FEDs sobre afloramento de calcário podem ser consideradas como relicários de diversidade genética, e carecem de informações ecológicas para subsidiar sua conservação. É importante a indicação, para conservação, populações que apresentem alta diversidade genética, e atributos genéticos que visam à manutenção da capacidade evolutiva da espécie, as chamadas ESU's (*Evolutionary Significant Unit*) (MANEL et al., 2003; MORITZ; FAITH, 1998). Neste sentido, a espécie *C. pubiflora* foi escolhida para este trabalho, em virtude da sua ocorrência nos afloramentos calcários visitados para este estudo, funcionando como espécie-modelo para os estudos de diversidade genética e inferências históricas filogeográficas, pela análise de sequências do genoma cloroplastidial.

Estudos genéticos utilizando DNA cloroplastidial (cpDNA) são importantes para inferências filogeográficas e sobre dispersão histórica de sementes, que refletem no padrão de distribuição da espécie. Por ser, em geral, de herança uniparental (frequentemente maternal, nas angiospermas), o polimorfismo observado na molécula de cpDNA pode ser relacionado

diretamente com características de história de vida da espécie, em relação à dispersão de sementes (herança maternal) e colonização de áreas, uma vez que o fluxo gênico, via dispersão de sementes, determina a estrutura genética, revelada pela análise do cpDNA (PETIT; KREMER; WAGNER, 1993). Além disso, o DNA do cloroplasto não sofre recombinação, sendo cópias transmitidas via sementes, e apresentam baixa taxa de mutação (NEWTON et al., 1999), características importantes na reconstrução dos eventos históricos, como as expansões ou contrações das populações, rotas de migração, colonização de áreas e testar as hipóteses da história biogeográfica (BEHEREGARAY, 2008; ENNOS et al., 1999; MCCAULEY, 1995). Em Floresta Estacional Decidual, estudos de filogeografia foram realizados por Caetano et al. (2008) com a espécie *Astronium urundeuva* e Vieira et al. (no prelo) com a espécie *Ficus bonijesulapensis*.

Com a modernização das técnicas de sequenciamento automático de fragmentos de DNA, as análises de filogeografia tornaram-se mais acessíveis e precisas. Entretanto, além de obter um DNA extraído de boa qualidade do tecido vegetal, é imprescindível ajustar corretamente os procedimentos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e protocolos de purificação dos produtos da reação, evitando falhas durante a leitura dos fragmentos de DNA nos sequenciadores. Desta forma, evitam-se gastos desnecessários e desoneram os custos finais da técnica de sequenciamento, obtendo leituras confiáveis dos polimorfismos nos fragmentos de cpDNA (SHAW et al., 2007; VIEIRA et al., 2010).

Assim, o objetivo com este trabalho foi selecionar *primers* universais de cpDNA, definindo ajustes nos protocolos de PCR e purificação da PCR para sequenciamento, buscando a otimização do processo. Este trabalho também buscou fazer inferências filogeográficas para espécie *Ceiba pubiflora*, tentando responder a seguinte questão: o padrão de distribuição dos haplótipos de cpDNA

corroboram com a hipótese do Arco Pleistocênico, proposto por Prado e Gibbs (1993)? Além disso, buscou-se elucidar a distribuição da variabilidade genética de *C. pubiflora* e indicar populações que possam funcionar como centros de diversidade genética da espécie, tendo em vista sua conservação em longo prazo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem e Coleta de Material

Para estudos de seleção de *primers* cpDNA e filogeografia de *Ceiba pubiflora*, amostras foliares ou de caule de indivíduos foram coletadas, em 13 populações, localizadas nos Estados de Minas Gerais na região sul, central e norte do Estado; Bahia, na região centro-sul do Estado e Goiás, no vale do rio Paranã (Tabela 1, Figura 1). As coletas foram feitas em Florestas Estacionais Deciduais sobre afloramento de calcário, com exceção da coleta realizada no município de Minduri (MG) em Floresta Estacional Semidecidual Baixomontana.

Tabela 1 Locais e tamanho amostral utilizado para o estudo de seleção de *primers* cpDNA e filogeografia de *Ceiba pubiflora*.

Locais	Código	Estado	Tamanho amostral	Coordenadas		Domínios
Gruta da Lapa Doce	GLD	BA	02	12°19'53"S	41°36'23"W	Caatinga
São Desidérico	SAD	BA	07	12°22'52"S	44°56'58"W	Caatinga
Bom Jesus da Lapa	BJL	BA	02	13°03'13"S	43°17'28"W	Caatinga
Montalvânia	MON	MG	08	14°28'21S	44°22'14"W	Caatinga
Manga (P. Est. Mata Seca)	MAN	MG	07	14°50'00"S	43°55'12"W	Caatinga
Januária	JAN	MG	10	15°08'03"S	44°14'58"W	Caatinga
Nova Roma	NOR	GO	07	13°42'25"S	46°51'14"W	Cerrado
Vila Propício	VIP	GO	12	15°29'14"S	48°51'52"W	Cerrado
Santo Hipólito	SAH	MG	11	18°17'23"S	44°11'13"W	Cerrado
Matozinhos	MAT	MG	11	19°33'08"S	44°04'14"W	Atlântico
Doresópolis	DOR	MG	01	20°18'25"S	45°55'08"W	Atlântico
Arcos	ARC	MG	01	20°19'52"S	45°34'43"W	Atlântico
Minduri	MIN	MG	04	21°39'53"S	44°37'50"W	Atlântico

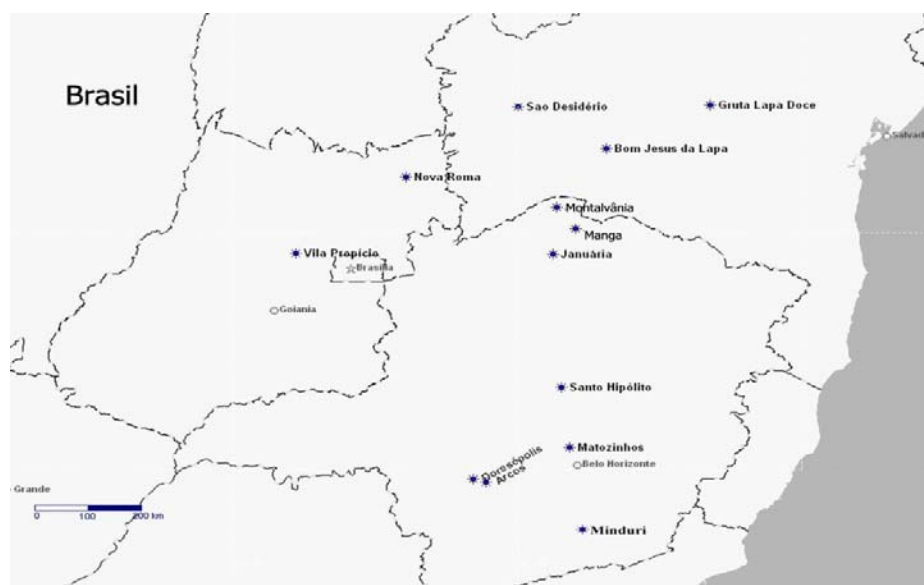


Figura 1 Localização das populações amostradas de *Ceiba pubiflora*, nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás.

As amostras foliares foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados, contendo sílica gel para desidratação e preservação do tecido foliar. Quando não foi possível a coleta de folhas dos indivíduos, retirou-se cuidadosamente pequena parte do tecido caulinar vivo, acondicionado em tubos contendo tampão CTAB 5% para conservação do material. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, localizado na Universidade Federal de Lavras, no Departamento de Ciências Florestais da instituição, para acondicionamento a -20 °C até o momento da extração do DNA.

2.2 Extração do DNA e Reação PCR-cpDNA

O DNA dos 83 indivíduos de *Ceiba pubiflora* coletados foi extraído seguindo o protocolo descrito em Doyle e Doyle (1990), com alguns ajustes. Amostras dos tecidos foliares ou caulinares, aproximadamente 200mg, foram macerados com solução extratora, pré aquecida a 65 °C, contendo: 100 mM de Tris pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; 1% (p/v) PVP-40 e 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol. O DNA foi ressuspensionado em solução TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA, pH 8,0). Para verificar a qualidade e concentração do DNA total extraído, alíquotas foram aplicadas e comparadas com DNA de concentração padrão, em gel de agarose 1% e submetidas à eletroforese. Em seguida o DNA concentrado foi diluído em alíquota para solução de trabalho, entre 3 a 5 ng/ μ L, e armazenado a -20 °C até o momento da reação de PCR-cpDNA.

Foram testados 13 pares de *primers* (*forward* e *reverse*) universais de cpDNA (DEMASURE; SODZI; PETIT, 1995; DUMOLIN-LAPÈGUE; PEMONGE; PETIT, 1997; SHAW et al., 2007; TABERLET et al., 1991) para a espécie *C. pubiflora*, (Figura 2; Tabela 2). A reação de amplificação PCR-cpDNA seguiu-se em volume final de 15 μ L, constituído de 1,5 μ L tampão de reação 10x IB (Phoneutria – 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100; 15 mM MgCl₂); 1,5 μ L de BSA (2,5 ng/mL); 1,5 μ L de DNTps a 2,5 mM, 1 μ L de cada *primer* a 1 μ M; 3,4U/ μ L de Taq polimerase (Phoneutria); 4,0 μ L de DNA a aproximadamente 5 ng/ μ L.

A programação da PCR em termociclador ABI GeneAmp Thermal Cycler 9700 foi desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos

com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 53 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final a 72° por 10 minutos. Para verificar o sucesso da reação de PCR, o produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em solução de TBE a 0,5x, corado com brometo de etídio, e fotografado sobre luz ultravioleta pelo sistema de fotodocumentação *UVP Doc-It-LS* (Figura 2).

2.3 Purificação da Reação cpDNA com Enzimas de Restrição

Os produtos da reação PCR-cpDNA foram purificados utilizando enzimas *Shimp Alkaline Phosphatase* (SAP) a 1 U/ μ L e *Exonuclease I* (EXO) a 20U/ μ L (mix de restrição), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Fermentas). As enzimas eliminam fragmentos de DNA amplificados de forma incorreta e resíduos de *primers* e dNTPs. Para 5 μ L de reação de PCR-cpDNA, utilizou 2 μ L do mix de restrição. Em seguida, as amostras foram levadas para o termociclador, onde as enzimas foram ativadas a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, desnaturadas a 80 °C por 20 minutos. Após esse processo, o produto purificado foi armazenado em gelo até o momento da reação de preparo para o sequenciamento automático.

2.4 Reação de Preparo e Purificação para Sequenciamento

Após a reação de purificação da PCR-cpDNA, os produtos dessa etapa foram submetidos à reação de preparo para o sequenciamento. Nesta etapa, os fragmentos amplificados são novamente submetidos à PCR, com a presença de somente um dos *primer* (*forward* ou *reverse*) e bases nucleotídicas marcadas

com fluorescência, para leitura automatizada do sequenciador, modelo ABI 3500. Foi selecionado de três a quatro indivíduos de cada população para sequenciamento prévio, para observar aquelas regiões que apresentam polimorfismo.

O protocolo seguido foi o recomendado pelo fabricante do kit de sequenciamento (Life Technologies), sendo realizados alguns ajustes para otimização do processo. A reação seguiu-se a um volume final de 10 μL , sendo 3 μL de produto purificado da PCR-cpDNA, que deve conter entre 15 a 30 ng do produto purificado, 1 μL de *primer* (*forward* ou *reverse*) a 1 μM , 1,5 μL *BigDye Terminator Cycle Sequencing Standart* v3.1 e 1 μL do tampão de diluição fornecido com o kit de sequenciamento.

O mix de reação foi colocado no termociclador, submetido à desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 segundos, anelamento do *primer* a 50 °C por 5 segundos, com rampa de decaimento de temperatura no termociclador de 1 °C/segundo, extensão a 60 °C por 4 minutos e finalização a 4 °C (até retirada do mix do aparelho).

Para a purificação dos produtos da PCR de sequenciamento foram adicionados EDTA a 125 mM e álcool etílico absoluto em cada amostra, deixado à temperatura ambiente por 15 minutos protegido da luz. Após processo de centrifugação a 4 °C a 3000 rpm por 30 minutos, foi retirado o sobrenadante e adicionou-se etanol 70%. Após nova centrifugação, agora a 1650 rpm por 15 minutos, foi retirado o sobrenadante e prosseguiu o processo de secagem a 75 °C por 15 minutos, protegido da luz. Em cada amostra foi adicionado 9 μL de formamida *Hi-Dy*, seguida de desnaturação em termociclador por 5 minutos a 95 °C, e levadas para sequenciamento automático no ABI 3500.

2.5 Seleção de Primers cpDNA e Número de Haplótipos

Após reação de PCR-cpDNA e eletroforese em gel de agarose 1%, os *primers* e os indivíduos que apresentaram o padrão de amplificação com a observação de única banda consistente no gel (Figura 2), foram selecionados para o processo de purificação e sequenciamento da região de cpDNA (n=83).

Com as regiões do cpDNA sequenciadas, os resultados foram importados para o programa BioEdit (HALL, 1999) para correção manual das sequências, segundo os resultados dos eletroferogramas, gerados pelas leituras das bases nucleotídicas marcadas. Foram selecionados duas regiões do cpDNA para os estudos de filogeografia de *C. pubiflora*, de acordo com a observação de polimorfismo nas sequências.

A detecção das diferentes sequências (haplótipos) foi verificada a partir do alinhamento dessas regiões de cada indivíduo analisado. Para isso, foi utilizado o método Clustal-W (THOMPSON; HIGGINS; GILSON, 1994) implementado pelo programa Mega v.4.0 (TAMURA et al., 2007). O programa DNASP 4.1 (ROZAS et al., 2003) foi utilizado para determinar o número de haplótipos e sua frequência na amostra, bem como a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade haplotípica (H_D). Os resultados foram empregados na geração de gráfico de distribuição esperada dos haplótipos, com auxílio do programa Network (BANDELT; FORSTER; ROHL, 1999), onde redes são construídas baseadas no algoritmo de *median-joinig*. Árvores de filogenias são construídas com o menor número de mudanças entre haplótipos, ou rede de '*minimum spanning*' gerada a partir da sequência do cpDNA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção dos Primers cpDNA

Os *primers* de melhor desempenho na amplificação da PCR-cpDNA para *Ceiba pubiflora* foram EF, CD, HA, CY6, CS3, BF, QS2 e 20-12 (Tabela 2, Figura 2). As regiões inter-gênicas do cloroplasto são valiosas fontes de informações para estudos em genética de populações, biogeografia e biologia da conservação. É fator importante selecionar, dentre os *primers* universais de cpDNA, aqueles que possam revelar as informações necessárias para quantificar a diversidade genética e estabelecer centros de refúgio ou de diversidade da espécie, desonerando, assim, os custos finais da técnica.

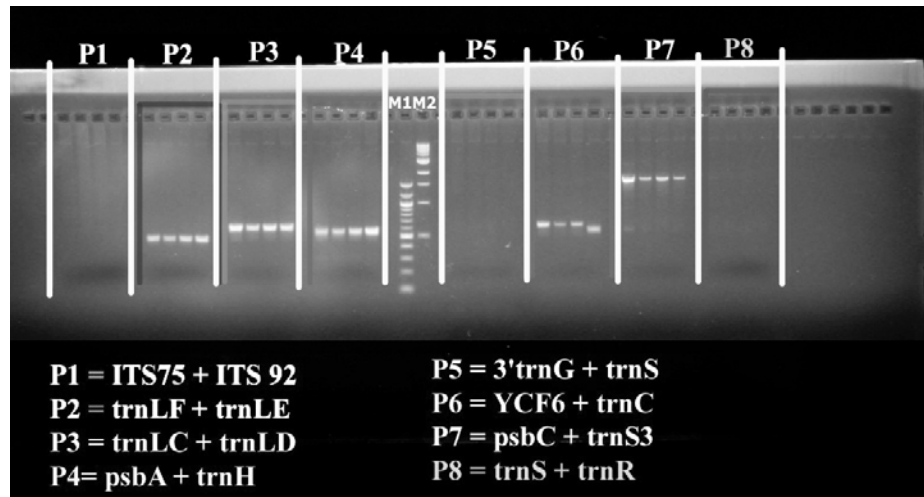


Figura 2 Fragmentos de cpDNA amplificados em quatro indivíduos de *Ceiba pubiflora* em gel de agarose 1%, para pares de *primers* cpDNA (P1 a P8). Marcador de peso molecular M1=100pb e M2=1Kb.

Tabela 2 Nome e sequência dos *primers* universais de cpDNA, status de amplificação, tamanho (pb) sequenciado e polimorfismo observado nas amostras de *Ceiba pubiflora*. NS=Não Sequenciado.

Primer	Nome	Sequência 5'-3'	Amplif.	Pares de Base (pb)	Polim.
ITS 92 ITS 75	ITS 92-75*	AAG GTT TCC GTA GGT GAA TAT GCT TAA ACT CAG CGG G	NÃO	-	-
trnLE trnLF	EF	GG TTC AAG TCC CTC TAT CCC ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	SIM	470	SIM
<i>trnC</i> <i>trnD</i>	CD	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC GGG ATT GTA GTT CAA TTG GT	SIM	600	SIM
<i>trnH</i> <i>psbA</i>	HA	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC	SIM	NS	-
trnS trnG	SG	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C	NÃO	-	-
ycf6 trnC	CY6	GCC CAA GCR AGA CTT ACT ATA TCC AT CCA GTT CRA ATC YGG GTG	SIM	610	SIM
psbC trnS3	CS3	GGT CGT GAC CAA GAA ACC AC GGT TCG AAT CCC TCT CTC TC	SIM	940	SIM
trnS trnR	SR	CGC CGC TTT AGT CCA CTC A ATT GCG TCC AAT AGG ATT TGA A	NÃO	-	-
<i>psbB</i> <i>psbF</i>	BF	GTT TAC TTT TGG GCA TGC TTC G CGC AGT TCG TCT TGG ACC AG	SIM	800	NÃO
trnQ trnS2	QS2	GGG ACG GAA GGA TTC GAA CC ATT GCG TCC AAT AGG ATT TGA A	SIM	NS	-
<i>rpl 20</i> <i>rps 12</i>	20-12	CGY YAY CGA GCT ATA TAT CC ATT AGA AAN RCA AGA CAG CCA AT	SIM	NS	-
<i>trnV</i> rbcL	VL	CGA ACC GTA GAC CTT CTC GG GCT TTA GTC TCT GTT TGT GG	NÃO	-	-
<i>trnF</i> <i>trnV</i>	FV	CTC GTG TCA CCA GTT CAA AT CCG AGA AGG TCT ACG GTT CG	NÃO	-	-

* Fragmento de região de DNA nuclear.

Para acessar a variação que ocorre na cadeia do DNA do cloroplasto, algumas técnicas podem ser empregadas, como a digestão por enzimas de restrição (LAVIN; MATTHEWS; HUGHES, 1991; LUMARET et al., 2002), ou a digestão de regiões específicas amplificadas pela PCR, delimitadas pelos *primers* de cpDNA (CARON et al., 2002; NOVAES et al., 2010; RENDELL; ENNOS, 2003). O desenvolvimento de iniciadores (*primers*) universais de regiões específicas do cpDNA foi um importante avanço para aprimorar as técnicas de estudos em filogeografia, baseados nas variações na sequência dessas moléculas. As principais contribuições para o desenvolvimento desses *primers* foram as de Demesure, Sodzi e Petit (1995), Dumolin-Lapègue, Pemonge e Petit (1997), Shaw et al. (2007) e Taberlet et al. (1991).

A facilidade de se utilizar *primers* universais, na reação em cadeia da polimerase, está associada ao fato dos pares iniciadores estarem localizados em regiões conservadas do cpDNA, sendo uma molécula que apresenta baixa taxa de evolução molecular e estrutura geralmente bem conservada (EBERT; PEAKAL, 2009). Por outro lado, alterações como deleção, inserção ou inversão de bases nucleotídicas, nos sítios de anelamento desses *primers*, podem interferir na amplificação do fragmento, esses eventos podem explicar a não amplificação de algumas regiões por eles delimitada (Tabela 2). Por outro lado, essas alterações, ao longo da molécula do cpDNA, são importantes para os estudos filogeográficos.

A evolução das técnicas automatizadas de sequenciamento e genotipagem de DNA possibilitou um grande avanço em estudos filogeográficos. É crescente os estudos em filogeografia utilizando a variação observada em microssatélites presentes no cpDNA ((FAY et al., 2009; HEUERTZ et al., 2004; MAGRI et al., 2007; POWELL et al., 1995; PROVAN et al., 1999)) e sequenciamento de segmentos intergênicos desta molécula (BREEN; MURRAY; OLSON, 2012; COLLEVATTI; RABELO; VIEIRA,

2009; IWASAKI et al., 2012; NOVAES et al., 2010; RAMOS; LEMOS-FILHO; LOVATO, 2009; RANA; NARZARY; OHRI, 2012). Neste trabalho, das oito regiões de cpDNA amplificadas, cinco foram bem sucedidas no sequenciamento automático desses fragmentos: EF, com tamanho aproximado de 470 pb; CD, com 600 pb; CY6, com 610 pb, CS3 com 940 bp e BF com 800 pb. As regiões EF, CD, HA, CY6 e CS3 apresentaram polimorfismos, dentre os indivíduos e populações avaliadas, sendo potencialmente informativas para estudos de filogeografia e diversidade genética de *Ceiba pubiflora*.

3.2 Inferências Filogeográficas de *Ceiba pubiflora*

Para o estudo de filogeografia, foram selecionadas as regiões EF e CS3. A região EF revelou a existência de quatro haplótipos (Tabela 3) em um fragmento analisado de 253 pares de base (pb), e a região CS3, com nove haplótipos (Tabela 4) em fragmento analisado de 607 pb.

Tabela 3 Frequência, localização e distribuição dos haplótipos (Hapl.) em cada população de *Ceiba pubiflora* para a região EF do cpDNA, n=83. GLD: Gruta da Lapa Doce; SAD: São Desidérico; BJL: Bom Jesus da Lapa; MON: Montalvânia; MAN: Manga; JAN: Januária; NOR: Nova Roma; VIP: Vila Propício; SAH: Santo Hipólito; MAT: Matozinhos; DOR: Doresópolis; ARC: Arcos; MIN: Minduri.

Hapl.	Polimorfismo (pb)			GLD	SAD	BJL	MON	MAN	JAN	NOR	VIP	SAH	MAT	DOR	ARC	MIN	Freq.
	1	2	2														
	6	3	4														
H1	-	C	T		1	2	4	2			2	5	4	1	1	3	25
H2	T	G	T	2	1		4	3	10	1	10	6	7			1	45
H3	T	C	T					2									2
H4	T	C	G		5					6							11

Tabela 4 Frequência, localização e distribuição dos haplótipos (Hapl.) em cada população de *Ceiba pubiflora* para a região CS3 do cpDNA, n=49. GLD: Gruta da Lapa Doce; SAD: São Desidérico; BJL: Bom Jesus da Lapa; MON: Montalvânia; MAN: Manga; JAN: Januária; NOR: Nova Roma; VIP: Vila Propício; SAH: Santo Hipólito; MAT: Matozinhos; DOR: Doresópolis; ARC: Arcos; MIN: Minduri.

Hapl.	Polimorfismo (pb)							GLD	SAD	BJL	MON	MAN	JAN	NOR	VIP	SAH	MAT	DOR	ARC	MIN	Freq.
	3	3	5	5	5	5	6														
	1	7	0	2	4	9	0														
H5	T	A	-	-	-	-	-	2	2		3	8	4	4	5	3	8	1	1	2	37
H6	T	A	A	-	-	-	G			1											1
H7	T	G	-	-	-	-	-	1													1
H8	T	A	-	C	-	-	-				1						1				1
H9	C	A	-	-	-	-	-				1		1								2
H10	T	A	-	-	-	T	-		1					1							3
H11	T	A	-	-	A	T	-														1
H12	T	A	A	-	-	-	-					2									2
H13	T	A	-	-	-	T	G								1		1				1

A diversidade nucleotídica (π) foi de 0,0002 e 0,0019 para as regiões CS3 e EF, respectivamente. A diversidade haplotípica foi maior para a região EF, com $H_D = 0,610$, e a região CS3 apresentou $H_D = 0,429$. A rede *median-joining* de haplótipos mostra que os haplótipos mais comuns são H5-CS (37,1%), H2-EF (37,1%) e H1-EF (23,1%); os dois primeiros haplótipos compartilham o maior número de ligações entre os demais haplótipos (Figura 3).

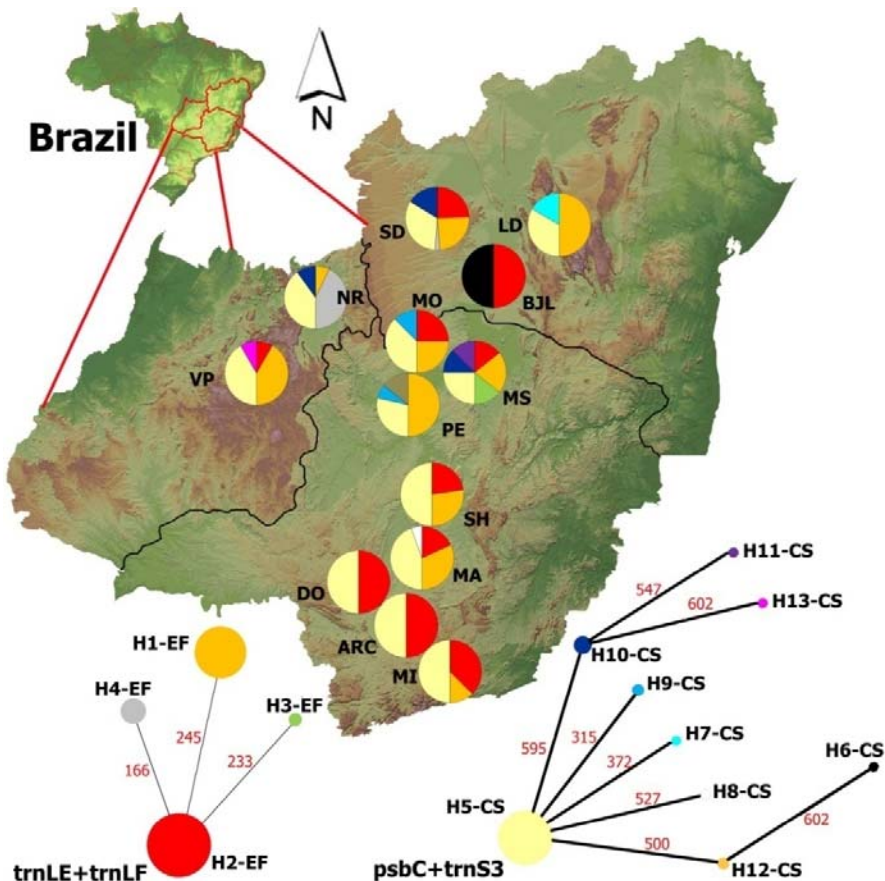


Figura 3 Distribuição dos haplótipos amostrados (EF e CS3 do cpDNA) de populações de *Ceiba pubiflora*, em regiões cársticas nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. As áreas dos círculos da rede são proporcionais às frequências dos haplótipos.

Os haplótipos encontrados na periferia da rede *median-joining*, em grande parte, foram exclusivos para algumas populações (Figura 3). Os haplótipo H3-EF (cor verde) e H11-CS (cor roxa) foram encontrados somente na população do Parque Estadual da Mata Seca (MS), no município de Manga – MG. A população de Matozinhos (MA), pertencente ao grupo centro-sul da área amostrada no Estado de Minas Gerais, apresentou como sendo exclusivo da sua população o haplótipo H8-CS (cor branca). Essa população foi a única deste grupo a apresentar um haplótipo exclusivo. As populações de Bom Jesus da Lapa (BJL; H6-CS, cor preta), Gruta Lapa Doce (LD; H7-CS, cor azul claro), Parque Estadual do Peruaçu (PE; H12-CS, cor marrom) e Vila Propício (VP; H13-CS, cor rosa) apresentaram haplótipos exclusivos na região mais ao norte.

Na região centro-sul do Estado de Minas Gerais concentra três haplótipos com maior frequência de ocorrência (H5-CS; H2-EF e H1-EF). Isso pode ser um indício de uma redução demográfica seguida de uma expansão recente nas florestas secas, demonstrada pelo baixo polimorfismo com o cloroplasto dessa região. A região mais ao norte de Minas Gerais, o Estado de Goiás e Bahia apresentam uma maior diversidade de haplótipos (Figura 3). Como sugerido por Caetano et al. (2008) e Posada e Crandall (2001): haplótipos com alta frequência nas diferentes populações apresentam alta probabilidade de serem os mais antigos, sendo estes compartilhando conexões mutacionais com outros haplótipos antigos, e os haplótipos mais recentes são detectados mais na periferia da rede.

Observa-se um padrão de maior diversidade de haplótipos nas regiões das bacias do Rio Paraná (Estado de Goiás) e Rio São Francisco (norte de Minas Gerais e Bahia), situados em latitude aproximadamente igual. Isso pode ser um indício de isolamento dessa região, uma vez que não se observam a presença desses haplótipos no grupo centro-sul de Minas Gerais. A maior diversidade de

haplótipos encontrados indica que as bacias do Rio São Francisco e Paranã, podem ser consideradas como fonte ou centros de diversidade. Esses centros, entretanto, não podem ser apontados, *a priori*, como centros de origem ou refúgio da espécie. Por outro lado, a região do São Francisco é apontada como centro de dispersão de várias espécies ((SPICHIGER; CALENGE; BISE, 2004). Santos et al. (2012) apontam a Caatinga Arbórea, Unidade de FED ecotonal entre o Cerrado e a Caatinga típica, que ocorre no norte de Minas Gerais e sul da Bahia, como um centro de alta diversidade de espécies, sugerindo que essa área possa ser um local de refúgio do Quaternário tardio. Sendo assim, o padrão de ramificação dos haplótipos observado na rede (Figura 3) pode sugerir uma expansão demográfica para a espécie *C. pubiflora* a partir da região norte de Minas Gerais, Bahia e Goiás em direção ao Sul. Essa informação poderá ser confirmada com mais dados, como por exemplo, o estudo de filogeografia de *Ficus bonijesulapensis* (VIEIRA et al., dados não publicados) que também ocorrem nessas regiões amostradas, e apresentam biologia reprodutiva diferentes.

É importante mencionar também que os limites da Caatinga, no norte de Minas Gerais, pode ter delimitado a dispersão histórica de sementes, mantendo o grupo centro-sul do Estado separado do grupo mais ao norte, como também sugerido em Caetano et al. (2008). A área mais contínua de Floresta Estacional Decidual na região norte, possivelmente propiciou maior fluxo de sementes e estabelecimento de indivíduos, revelado pela presença dos haplótipos nas diferentes populações. Além disso, as sequências de expansão e retração das florestas secas, nos períodos glaciais e interglaciais, respectivamente, podem ter causado ciclos de propagação e extinção de populações de *Ceiba pubiflora*, sendo perdidos os haplótipos de baixa frequência, como sugerido em Collevatti, Rabelo e Vieira (2009),, acentuando o efeito fundador nessas populações.

A distribuição disjunta das Florestas Estacionais Deciduais (FEDs) é discutida por duas principais linhas: a da dispersão limitada, que busca explicar a ampla distribuição continental de espécies neotropicais de FEDs (LINARES-PALOMITO; OLIVEIRA-FILHO; PENNINGTON, 2011; MAYLE et al., 2004), com eventos de dispersão de longas distâncias como *stepping-stone* de migração; e a hipótese do Arco Pleistocênico (PRADO; GIBBS, 1993). Segundo essa última hipótese, as FEDs resultam, provavelmente, de origem vicariante, após isolamento provocado pelo recuo das Florestas Secas e avanço do Cerrado no Brasil Central (PENNINGTON; PRADO; PENDRY, 2000; PRADO; GIBBS, 1993; WERNECK, 2011). O compartilhamento de haplótipos entre a região Norte e Sul fundamenta essa hipótese.

Os enclaves de FEDs no Cerrado no Brasil central, como por exemplo, no Vale do Rio Paranã, são locais de endemismo (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 1995), com espécies relacionadas com a Caatinga, distante geograficamente dessa formação. Essa ligação pode ser associada com o deslocamento de outros núcleos de FEDs, como proposto na hipótese do Arco Pleistocênico (PRADO; GIBBS, 1993). Os dados de cpDNA, mostrados neste trabalho, vão de encontro à possibilidade que essas áreas formavam um contínuo de FED no passado, como apontando por Caetano et al. (2008). Por outro lado, o padrão observado para as populações centro-sul de Minas Gerais pode sugerir uma dispersão em trampolim (*stepping-stone*) mais recente da espécie nessa região, provavelmente facilitada pela dispersão anemocórica da espécie. Neste caso, notam-se sinais do efeito fundador nessas populações, ou seja, poucos indivíduos deram início à colonização dessas áreas, que poderá ser comprovado com estudos com DNA nuclear nessas populações (BRANDÃO et al., dados não publicados). Entretanto, a hipótese da dispersão limitada (LINARES-PALOMITO; OLIVEIRA-FILHO; PENNINGTON, 2011; MAYLE et al., 2004), para explicar o padrão aqui observado, deve ser levantada com ressalvas,

pois mesmo o vento sendo capaz de dispersar sementes a longas distâncias (HORN; NATHAN; KAPLAN, 2001), o habitat fora das FEDs sobre afloramento de calcário pode ser uma barreira para o estabelecimento da espécie, impedindo a sua migração para outras áreas.

Por fim, os resultados de filogeografia obtidos do cpDNA de *Ceiba pubiflora* parecem corroborar com os observados por Caetano et al. (2008) e Collevatti, Rabelo e Vieira (2009), que apóiam a hipótese do Arco Pleistocênico, proposto por Prado e Gibbs (1993) de formação contínua de FEDs, uma vez que a disponibilidade de um habitat contínuo favorável para a ocorrência de *C. pubiflora* (FED) pode explicar a expansão da distribuição geográfica da espécie. Entretanto, outros dados de filogeografia e paleobotânicos, abrangendo mais espécies e maior área de ocorrência das FEDs, possibilitarão melhor entendimento da história das Florestas Estacionais Deciduais na América do Sul. Com tudo, segundo os resultados aqui apresentados sobre a diversidade haplotípica do cpDNA para a espécie *C. pubiflora*, as populações encontradas no vale do rio Paranã, no Estado de Goiás, o norte de Minas Gerais e sul da Bahia devem conter áreas de preservação dessa diversidade, para garantir a manutenção da capacidade evolutiva da espécie.

4 IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO

As Florestas Estacionais Deciduais sobre afloramento de rochas carbonáticas são considerados hoje, na maioria, como remanescentes de um contínuo de FED. Áreas como as localizadas no norte de Minas Gerais e vale do rio Paraná apresentavam, em um passado recente, grandes áreas de FEDs, que deram lugar, principalmente nessas últimas quatro décadas, a grandes áreas destinadas à agricultura e pastagem, para criação de gado (ESPÍRITO-SANTO et al., 2009; SCARIOT; SEVILHA, 2005). Nesses últimos anos, as FEDs foram negligenciadas, sendo destruídas, muitas vezes de forma ilegal, com extensas áreas florestais desmatadas para produção de carvão vegetal. Além disso, a exploração de calcário para produção de cimento é uma constante ameaça para essas formações, frente ao crescimento urbano. Sendo assim, sua conservação torna-se primordial para garantir a sobrevivência de espécies endêmicas de plantas, aves, mamíferos, dentre outras (SANTOS et al., 2012; SILVA; BATES, 2002; WERNECK; COLLI, 2006).

Estudos no Brasil abordando a diversidade genética em populações naturais de plantas crescem a cada ano. A modernização das técnicas moleculares e maior acesso a essas tecnologias, propiciam um grande avanço para o entendimento da dinâmica em genética de populações. Com tudo, é importante a disponibilização de informações que sejam úteis para desonerar os custos destes estudos. Neste sentido, este trabalho subsidia outros futuros utilizando marcadores cpDNA, a fim de evitar gastos desnecessários e aperfeiçoar o processo de sequenciamento de fragmentos de DNA, dessa espécie e de outras próximas filogeneticamente.

Os trabalhos de filogeografia com espécies de Florestas Estacionais Deciduais são importantes, principalmente para elucidar os processos históricos

que levaram à atual distribuição dessas formações, e indicar locais prioritários para conservação da diversidade genética da espécie. Neste estudo, ficou evidente que as populações encontradas na área ecotonal entre Caatinga e Cerrado, no Vale do rio Paranã e região norte de Minas Gerais e sul da Bahia, são centros de diversidade genética, portanto, prioritários para conservação. Além disso, os resultados de filogeografia de *C. pubiflora*, parecem corroborar com a hipótese de Arco Pleistocênico, proposto por Prado e Gibbs (1993), suportados por estudos genéticos como os de Caetano et al. (2008), Collevatti, Rabelo e Vieira (2009) e Vieira et al. (*no prelo*).

REFERÊNCIAS

- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 37-48, Feb. 1999.
- BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, p. 3754-3774, Sept. 2008.
- BREEN, A. L.; MURRAY, D. F.; OLSON, M. S. Genetic consequences of glacial survival: the late quaternary history of balsam poplar (*Populus balsamifera* L.) in North America. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 918-928, May 2012.
- CAETANO, S. et al. The history of seasonally dry tropical forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 3147-3159, July 2008.
- CARON, H. et al. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1089-1098, Aug. 2000.
- COLLEVATTI, R. G.; RABELO, S. G.; VIEIRA, R. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), a endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 4, p. 655-664, Sept. 2009.
- DEMASURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R. J. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 129-131, Mar. 1995.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, Feb. 1990.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; PEMONGE, M. H.; PETIT, R. J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 393-397, Apr. 1997.

EBERT, D.; PEAKALL, R. A new set of universal *de novo* sequencing primers for extensive coverage of noncoding chloroplast DNA: new opportunities for phylogenetic studies and cpSSR discovery. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 777-1075, May 2009.

ENNOS, R. A. et al. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: HOLLINGSWORTH, P. M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (Ed.). **Molecular systematics and plant evolution**. London: Taylor and Francis, 1999. p. 1-19.

ESPÍRITO-SANTO, M. M. et al. Sustainability of tropical dry forests: two case studies in southeastern and central Brazil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 258, n. 6, p. 922-930, Sept. 2009.

FAY, M. F. et al. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on northwestern Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. **Annals of Botany**, London, v. 104, n. 3, p. 517-525, Mar. 2009.

FELFILI, J. M. Fragmentos de florestas estacionais do Brasil Central: diagnóstico e proposta de corredores ecológicos. In: COSTA, R. B. (Org.). **Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na Região Centro-Oeste**. Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco, 2003. p. 139-160.

FELFILI, J. M. et al. Floristic composition and community structure of a seasonally deciduous forest on limestone outcrops in Central Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 611-621, jul./ago. 2007.

GIBBS, P.; SEMIR, J. Revisión taxonomica del genero *Ceiba* Mill. (Bombacaceae). **Anales del Jardín Botánico**, Madrid, v. 60, n. 2, p. 259-300, 2003.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEUERTZ, M. et al. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 3437-3452, Nov. 2004.

HORN, H. S.; NATHAN, R.; KAPLAN, S. R. Long-distance dispersal of tree seeds by wind. **Ecological Research**, London, v. 16, n. 5, p. 877-885, Dec. 2001.

IWASAKI, T. et al. Comparative phylogeography of four component species of deciduous broad-leaved forests in Japan based on chloroplast DNA variation. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 125, n. 2, p. 207-221, June 2012.

LAVIN, M.; MATTHEWS, S.; HUGHES, C. Chloroplast DNA variation in *Gliricidia sepium* (Leguminosae): intraspecific phylogeny and tokogeny. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 78, n. 11, p. 1576-1585, July 1991.

LINARES-PALOMINO, R.; OLIVEIRA-FILHO, A. T.; PENNINGTON, R. T. Neotropical seasonally dry forests: diversity, endemism, and biogeography of woody plants. In: DIRZO, R. et al. (Ed.). **Seasonally dry tropical forests: ecology and conservation**. Washington: Island, 2011. p. 3-22.

LUMARET, R. et al. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 2327-2336, Nov. 2002.

MAGRI, D. et al. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 24, p. 5259-5266, Dec. 2007.

MANEL, S. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 189-197, Apr. 2003.

MAYLE, F. et al. Responses of Amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the last maximum. **Philosophical Transactions Royal Society London, Series B: Biological Sciences**, London, v. 359, n. 1443, p. 499-514, Mar. 2004.

MCCAULEY, D. E. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 198-202, Apr. 1995.

MORITZ, C.; FAITH, D. P. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 419-429, Apr. 1998.

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 140-145, Feb. 1999.

NOVAES, R. M. L. et al. Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 7, p. 985-998, July 2010.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais:** mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 2006. 423 p.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 52, n. 1, p. 141-194, 1995.

PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of Neotropical savannas and seasonally dry forests. In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. (Ed.). **Neotropical savannas and seasonally dry forests:** plant diversity, biogeography and conservation. Boca Raton: CRC, 2006. p. 1-29.

PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. A.; PENDRY, C. Neotropical seasonally dry forests and Pleistocene vegetation changes. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 27, p. 261-273, Feb. 2000.

PETIT, R. J.; KREMER, A.; WAGNER, D. B. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, n. 2, p. 122-128, Mar. 1993.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 37-45, Jan. 2001.

POWELL, W. et al. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. **Proceedings**

National Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 92, n. 17, p. 7759-7763, Aug. 1995.

PRADO, D. E. Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 57, n. 3, p. 437-461, June 2000.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South-America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 80, n. 4, p. 902-927, Aug. 1993.

PROVAN, J. et al. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. **Genetics**, Austin, v. 153, n. 2, p. 943-947, Oct. 1999.

RAMOS, A. C. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. **Journal of Heredity**, Washington, v. 100, n. 2, p. 206-216, Oct. 2009.

RANA, T. S.; NARZARY, D.; OHRI, D. Molecular differentiation of *Chenopodium album* complex and some related species. **Gene**, Amsterdam, v. 495, n. 1, p. 29-35, Jan. 2012.

RENDELL, S.; ENNOS, R. A. Chloroplast DNA diversity of the dioecious European tree *Ilex aquifolium* L. (English holly). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 2681-2688, Oct. 2003.

ROZAS, J. et al. Dnasp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, June 2003.

SANTOS, R. M. et al. Identity and relationships of the Arboreal Caatinga among other floristic units of seasonally dry tropical forests (SDTFs) of north-eastern and Central Brazil. **Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 409-428, Feb. 2012.

SCARIOT, A.; SEVILHA, A. C. Biodiversidade, estrutura e conservação de florestas estacionais decíduais no Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 123-139.

_____. Diversidade, estrutura e manejo de florestas decíduais e as estratégias de conservação. In: CAVALCANTI, T. B. et al. (Org.). **Tópicos atuais em botânica**. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil; EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 183-188.

SHAW, J. et al. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 94, n. 3, p. 275-288, Mar. 2007.

SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **Bioscience**, Washington, v. 52, n. 3, p. 225-233, Mar. 2002.

SPICHIGER, R.; CALENGE, C.; BISE, B. Geographical zonation in the Neotropics of tree species characteristic of the Paraguay-Parana' Basin. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 31, n. 9, p. 1489-1501, Sept. 2004.

TABERLET, P. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 1105-1109, July 1991.

TAMURA, K. et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Aug. 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.; GILSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

VIEIRA, F. A. et al. Métodos de extração de DNA e seleção de *primers* de cpDNA para *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 4, p. 69-74, 2010.

WERNECK, F. P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews**, Oxford, v. 20, n. 13/14, p. 1630-1648, June 2011.

WERNECK, F. P.; COLLI, G. R. The lizard assemblage from seasonally dry tropical forest enclaves in the cerrado biome, Brazil, and its association with the

Pleistocenic Arc. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1983-1992, Nov. 2006.

WERNECK, M. S.; FRANCESCHINELLI, E. V.; TAMEIRÃO-NETO, E.
Mudanças na florística e estrutura de uma floresta decídua durante um período de quatro anos (1994-1998), na região do Triângulo Mineiro, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 401-413, jul./ago. 2000.