

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Programa Integrado de Pós Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais

**FILOGEOGRAFIA E ESTRUTURA GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DA MUNGUBEIRA (*PSEUDOBOMBAX
MUNGUBA* (MART. & ZUCC.) DUGAND, MALVACEAE -
BOMBACOIDEAE) NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Tatiana de Almeida Menicucci

Manaus, Amazonas
Junho, 2007

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Integrado de Pós Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais

FILOGEOGRAFIA E ESTRUTURA GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DA MUNGUBEIRA (*PSEUDOBOMBAX*
***MUNGUBA* (MART. & ZUCC.) DUGAND, MALVACEAE -**
BOMBACOIDEAE) NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Tatiana de Almeida Menicucci

Orientadora: Dra. Maristerra R. Lemes

Co-Orientador: Dr. Rogério Gribel

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas
Junho, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

G545 Menicucci, Tatiana de Almeida

Filogeografia e estrutura genética de populações da Mungubeira (*Pseudobombax Munguba* (Mart. & Zucc.) Dugand, Malvaceae – Bombacoideae / Tatiana de Almeida Menicucci.

Manaus : INPA/UFAM,
2007.

xiv, 67 f. : il. (algumas color.)

Dissertação de Mestrado -- INPA/UFAM, 2007.

Orientador: Dra. Maristerra R. Lemes.

Co-orientador: Dr. Rogério Gribel

1. Filogeografia -Amazônia 2. Genética de populações 3. Munguba

CDD 19^a ed. 575.01

Sinopse:

Estudou-se a filogeografia e a estrutura genética de populações de *P. munguba* na Amazônia brasileira, utilizando marcadores microssatélites e de seqüências não codificadoras do genoma de cloroplasto. Os dados gerados permitiram correlacionar as hipóteses biogeográficas da Amazônia e corroboram a hipótese do Lago Amazônico como determinante na estruturação genética atual das populações de árvores da várzea na Amazônia brasileira

Palavras-chave:

Filogeografia, genética de populações, munguba, Amazônia, microssatélites, cpDNA.

Dedico esta dissertação a meus pais Nélio e Teresa e meus irmãos Nélio, Renata e Marcelo. A família da qual tenho a sorte de fazer parte.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Teresa e meus irmãos Nélio, Renata e Marcelo pelo apoio e carinho não só nessa, mas em todas as fases da minha vida.

À FAPEAM e ao CNPq, pela bolsa de estudos, ao INPA, ao GCBEV que tornaram possível a concretização desse trabalho. E em especial ao Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas - LABGEN que de fato possibilitou a realização do trabalho por meio de projetos financiados aprovados pelos Drs. Maristerra Lemes e Rogério Gribel.

À Dra. Maristerra Lemes e Dr. Rogério Gribel pela orientação, apoio e convivência durante esses dois anos.

Às outras famílias que tive a sorte de pertencer: Paulinho, Wilde, Luciano, Geise Adília, Joana, Simão, Carla e Paula. Morar com vocês foi uma experiência única.

Aos amigos do LABGEN: Mahatma, Thieme, Grabiela, Izabela, Joicy, Rafael Angrizani, Rafael Arruda, Carolina, Raquel, Alessandra e Vanessa por suportar minhas brincadeiras e palhaçadas e pela ajuda nos momentos em que foi preciso.

À turma do GCBEV: Aline, Alexandre, Áureo (e Stella), Carlos, Eduardo, Fátima, Luciano, Raimundo e Walfran. Ter compartilhado esse tempo com vocês foi uma das melhores partes dessa experiência.

Aos amigos de BH, Marmotas e agregados: Ricardo, Éwerton, Marcelo, Henrique, Fernando, Léo, Rodrigo, Flávia, Éder, Danny, Rei e tantos outros que se num citei, saibam que mesmo longe, sempre serão lembrados. Os momentos com vocês foram inesquecíveis.

À família: Lossea, Derahel, Norman, Tota, Tiago, Felipe, Bruno, Monge, Bart, Semi, Maya, Beto, Apolo, Nikita, Thiago, Marcelo, Flecha, Maguchi e Angel. Vocês se tornaram minha terceira família, na qual tive apoio e companhia diários, essenciais para a conclusão dessa fase.

A todos os professores que me permitiram chegar até aqui, especialmente a Dra. Mônica Buchiarelli e o Dr. Rodrigo Redondo que me ensinaram a gostar de genética e biologia evolutiva, os maiores responsáveis por minha escolha.

A todos os amigos que deixei de mencionar peço desculpas, todos foram muito importantes para mim.

E finalmente ao meu pai, Nélio Menicucci. Infelizmente você nunca lerá esse trabalho, mas tenho certeza que esteve comigo em todos os momentos.

Muito obrigada por tudo!

"Ella está en el horizonte, dice Fernando Birri. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Caminamos diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré. Para qué sirve la utopía? Para eso sirve, para caminar."

Eduardo Galeano

RESUMO

A estrutura atual das populações de espécies de plantas não só reflete padrões atuais de trocas genéticas dentro e entre populações, mas também a história de fluxo gênico, isolamento entre linhagens e permanência de polimorfismos ancestrais. A filogeografia é um campo de estudo interessado em reconstruir a história das espécies visando determinar suas origens e respostas a alterações climáticas e outras perturbações ambientais ocorridas no passado que possam ter influenciado suas distribuições geográficas. Várias hipóteses biogeográficas têm sido levantadas para tentar explicar as origens da alta biodiversidade encontrada na Amazônia. No presente estudo são apresentados os padrões de distribuição da variabilidade genética e a filogeografia da mungubeira, *Pseudobombax munguba* (Mart. & Zucc.) Dugand na Amazônia brasileira, uma espécie arbórea da família Malvaceae que ocorre exclusivamente ao longo das várzeas amazônicas. Para as análises genéticas foram amostrados 162 indivíduos de *P. munguba* pertencentes a 11 populações distribuídas na Amazônia brasileira, utilizando oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto e 35 indivíduos, pertencentes a 9 populações, utilizando seqüências de DNA da região não codificadora do genoma de cloroplasto *trnS/trnG*. Na análise dos marcadores microssatélites foram observados 2 a 5 alelos por loco e um total de 35 haplótipos considerando os oito locos analisados em conjunto. Três populações (Beruri, Catalão e Caxiuanã), situadas no trecho médio e baixo da calha central do rio Solimões/Amazonas mostraram-se monomórficas. Os índices de diversidade genética de Nei variaram entre 0,0 e 0,433. A diversidade genética média total foi de 0,240 para todas as populações analisadas conjuntamente e de 0,301 quando apenas as populações polimórficas foram consideradas. Uma análise de variância molecular (AMOVA) utilizando todas as populações mostrou que a maior parte da variação genética encontrada pode ser explicada pela variação contida dentro das populações (59%), excluindo as populações monomórficas esse valor subiu para 66%. A análise utilizando o teste de Mantel, que correlaciona as distâncias genéticas e as distâncias geográficas entre as populações, analisadas par a par, indicou que não há isolamento por distância entre as populações de *P. munguba* na Amazônia brasileira. As seqüências da região não codificadora do genoma de cloroplasto *trnS/trnG* apresentaram 10 substituições nucleotídicas e somente três haplótipos foram identificados para o conjunto de populações de *P. munguba* analisado. Um desses haplótipos foi o mais freqüente (88,6%) e amplamente distribuído na Amazônia brasileira e os outros dois restritos às populações de Cruzeiro do Sul - AC e Caracará - RR. Os resultados obtidos sugerem um fluxo gênico materno bastante restrito entre as populações de *P.*

munguba na Amazônia brasileira. A pouca variação encontrada tanto nos marcadores microssatélites quanto nas seqüências do genoma de cloroplasto indicam que a história de colonização de *P. munguba* na Amazônia brasileira é recente e que a colonização da calha central dos rios Solimões e Amazonas é resultado de efeito fundador a partir de um único haplótipo. Em contraste, a alta variação encontrada nas populações localizadas nas áreas mais elevadas em relação ao nível do mar sugere que essas populações de *P. munguba* são as mais antigas na Amazônia brasileira. Os resultados obtidos com marcadores microssatélites e seqüências do genoma de cloroplasto de *P. munguba* sugerem que variações no nível do mar, ocorridas no final do Plioceno e início do Pleistoceno, afetaram fortemente o padrão de distribuição da diversidade haplotípica da espécie. Os resultados corroboram a hipótese biogeográfica do Lago Amazônico como determinante na estruturação genética das populações de árvores da várzea na Amazônia brasileira.

ABSTRACT

The current structure of plant populations reflects not only the present patterns of genetic exchange within and between populations, but also historical gene flow, lineage isolation, and maintenance of ancestral polymorphisms. Phylogeography is a field study interested in the reconstruction of history of species to understand their origins and responses to climatic and other environmental changes in the past that may have influenced their geographical distributions. Several biogeographical hypotheses have been raised to explain the origins of the high biodiversity found in the Amazon. The present study examined the distribution patterns of the genetic variability and the phylogeography of *Pseudombobax munguba* (Mart. & Zucc.) Dugand, a tree species of the Malvaceae family that occurs exclusively in the Amazonian seasonally flooded forests. For the genetic analyses, 162 individuals from 11 populations of *P. munguba* distributed in the Brazilian Amazon were sampled using eight microsatellite loci of the chloroplast genome, and 35 individuals belonging to nine populations of *P. munguba* were analysed based on variation of DNA sequences of the non-coding region *trnS/trnG* of the chloroplast genome. The microsatellite analysis found two to five alleles per locus and a total of 35 haplotypes over all eight loci. Three populations (Beruri, Catalão e Caxiuanã), located in the Middle and Lower Amazon river, showed no polymorphisms at all. The Nei genetic diversity indexes varied from 0.0 to 0.433. The mean genetic diversity was 0.240 for all populations analysed together and 0.301 considering only the polymorphic populations. An analysis of molecular variance (AMOVA) over all populations showed that the majority of the genetic variation was found within populations (59%). If only polymorphic populations have been considered, this value was 66%. The Mantel test, which correlates genetic and geographical distances between pairs of populations, indicated no isolation by distance between *P. munguba* populations in the Brazilian Amazon. The *trnS/trnG* non-coding sequences of the cpDNA contained 10 nucleotide substitutions and three haplotypes were identified in the nine populations of *P. munguba*. One haplotype was the most frequent (88.6%) and widely distributed in the Brazilian Amazon. The other two were restricted to the Cruzeiro do Sul – AC and Caracaraí – RR populations. The results suggest very restricted maternal gene flow among the *P. munguba* populations. The low variation found in the microsatellites and DNA sequences of the chloroplast genome indicates a recent history of colonization of *P. munguba* in the Brazilian Amazon and that the colonization in the Central and Lower course of the Amazon river represents a founder effect from a single haplotype. In contrast, the high variation found in the populations located at

more elevated areas above sea level suggests that these *P. munguba* populations are the most ancient ones in the Brazilian Amazon. The data from both microsatellites and DNA sequences from the chloroplast genome of *P. munguba* suggest that variations in sea level probably occurring in the late Pliocen and early Pleistocen strongly affected the patterns of distribution of the haplotypic diversity in this species. The results corroborate the Amazonian Lake biogeographical hypothesis as a determinant of the genetic structuring of populations in tree species of the seasonally flooded forests in the region.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localização das populações e número de indivíduos amostrados de <i>P. munguba</i> na Amazônia Brasileira.....	19
Tabela 2 - Características dos oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto amplificados para <i>P. munguba</i>	26
Tabela 3 - Haplótipos observados com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto, em 11 populações de <i>P. munguba</i>	29
Tabela 4 - Índices de diversidade genética, estimados para as populações de <i>P. munguba</i> com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto.....	31
Tabela 5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto de <i>P. munguba</i> considerando onze populações amostradas.....	31
Tabela 6 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto de <i>P. munguba</i> considerando somente as populações polimórficas.....	32
Tabela 7 - Matriz de correlação entre distâncias genéticas de Reynolds (abaixo da diagonal) e distâncias geográficas euclidianas (acima da diagonal, em Km) entre as populações de <i>P. munguba</i> , analisadas par a par.....	32
Tabela 8 - Características dos marcadores utilizados que amplificam regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto de <i>P. munguba</i>	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Indivíduos adultos de <i>P. munguba</i>	14
Figura 2 - Flor, frutos, sementes e dispersão de <i>P. munguba</i>	15
Figura 3 - Locais de Coleta de <i>P. munguba</i>	20
Figura 4 - Quantificação do DNA genômico total extraído de amostras de <i>P. munguba</i>	25
Figura 5 - Fragmentos amplificados a partir da análise de oito locos microssatélites do genoma do cloroplasto de <i>P.munguba</i>	27
Figura 6 - Eletroferogramas mostrando alelos de oito locos microssatélites do cpDNA amplificados para diferentes indivíduos de <i>P. munguba</i>	28
Figura 7 - Frequência de haplótipos observados na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto de <i>P. munguba</i>	30
Figura 8 - Relação entre distância genética de Reynolds e distância geográfica (Km) para 11 populações <i>P. munguba</i> , analisadas par a par, com base na variação observada em oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto.....	33
Figura 9 - Relações entre haplótipos a partir de análise de rede (<i>Network</i>), com base na variação de oito locos microssatélites do genoma do cloroplasto de <i>P. munguba</i> . Cada círculo se refere a um haplótipo.....	34
Figura 10 - Amplificação de regiões não codificadoras do cpDNA de <i>P. munguba</i>	37
Figura 11 - Eletroferogramas mostrando produtos do seqüenciamento de dois indivíduos de <i>P. munguba</i> para a região <i>trnS/trnG</i>	38
Figura 12 - Alinhamento de seqüências de DNA da região <i>trnS/trnG</i> do genoma do cloroplasto de <i>P. munguba</i>	39
Figura 13 - Relações entre os haplótipos obtidos a partir da análise das seqüências do espaçador intergênico <i>trnS/trnG</i> do genoma do cloroplasto de <i>P. munguba</i>	40
Figura 14 - Mapa mostrando a formação do lago amazônico, com base na simulação do alagamento da bacia amazônica, utilizando a topografia atual em função da elevação do nível dos oceanos na cota de 120m.....	48

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	III
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
SUMÁRIO.....	XIII
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PLANTAS	2
I.2. FILOGEOGRAFIA	3
I.3. HIPÓTESES BIOGEOGRÁFICAS - AMAZÔNIA	6
I.4. MARCADORES MOLECULARES.....	8
I.5. CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO PSEUDOBOMBAX	11
I.6. MORFOLOGIA, BIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE <i>PSEUDOBOMBAX MUNGUBA</i>	12
I.7. PSEUDOBOMBAX MUNGUBA E A VÁRZEA	16
I. 8. JUSTIFICATIVA	17
II. OBJETIVOS	18
III. MATERIAL E MÉTODOS	19
III.1. MATERIAL BIOLÓGICO E LOCAIS DE COLETA	19
III.2. EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DO DNA.....	20
III.3. AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS LOCOS MICROSSATELITES DO GENOMA DO CLOROPLASTO (CPDNA)	21
III.4. AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES NÃO CODIFICADORAS DO CPDNA	21
III.5. SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	22
III.6. ANÁLISE DOS DADOS	23
VI. RESULTADOS.....	25
IV.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	25
IV.2. AMPLIFICAÇÃO, GENOTIPAGEM E ANÁLISE DOS LOCOS MICROSSATÉLITES DO GENOMA DO CLOROPLASTO (CPDNA)	25
IV.3. AMPLIFICAÇÃO, SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DAS REGIÕES NÃO CODIFICADORAS DO CPDNA.....	36
V. DISCUSSÃO	41
VI. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

I. INTRODUÇÃO

A estruturação genética de populações de plantas é fortemente influenciada por padrões de trocas genéticas dentro e entre populações. Variações em fatores relacionados à reprodução das espécies e à história de vida podem afetar profundamente a natureza dos padrões de trocas genéticas e, conseqüentemente, a estrutura genética das populações (Schaal *et al.*, 1998; Gribel, 2003). Muitas espécies atuais que possuem distribuição contínua podem ter experimentado altos níveis de fragmentação populacional no passado como conseqüência de alterações climáticas e outras perturbações ambientais (Haffer, 1969; Prance, 1982; Schaal *et al.*, 1998; Hewitt, 2000, 2004; Dynesius & Jansson, 2000; Cavers *et al.*, 2003).

A filogeografia é um campo de estudo interessado nos princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente aquelas intimamente relacionadas, reconhecendo subdivisões de populações ao longo da distribuição da espécie (Avice, 1998, 2000). Existe atualmente considerável interesse em reconstruir a história dessas espécies visando determinar suas origens e suas respostas a essas alterações (Schaal *et al.*, 1998; Hewitt, 2000, 2004; Cavers *et al.*, 2003; Dutech *et al.*, 2003).

Tentando explicar as origens da alta biodiversidade encontrada na Amazônia, foram formuladas várias hipóteses: Rios como Barreiras (Wallace, 1849; Capparella, 1988; Ayres & Clutton-Brock, 1992; Haffer, 1992; Patton *et al.*, 1994); a Teoria dos Refúgios (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970; Cerqueira, 1982; Prance, 1982); Centros de Origem e Dispersão (Hershkovitz, 1977; Reig, 1984); Gradientes Ecológicos (Endler, 1977, 1982; Patton *et al.*, 1994); Vicariância Geotectônica (Platnick & Nelson, 1978; Cracraft & Prum, 1988; Futuyma, 1992; Amorim & Pires, 1996); Lago Amazônico (Klammer, 1984); e Dinâmica dos Rios (Salo *et al.*, 1986).

Ainda são poucos os estudos filogeográficos com espécies de plantas na Amazônia. Olsen & Schaal (1999) e Olsen (2002) realizaram estudos com *Manihot esculenta* no norte e centro-oeste do Brasil, encontrando uma estrutura filogeográfica que pode ser explicada pelas alterações climáticas após a última grande glaciação. Dutech *et al.* (2003) encontraram evidências de que os quatro refúgios sugeridos por Granville (1988) foram de grande importância para a manutenção da diversidade de *Vouacapoua americana* na

Guiana Francesa. Segundo Dick *et al.* (2003), a distribuição dos haplótipos encontrados nas populações de *Symphonia globulifera* coincide com as zonas biogeográficas propostas por Whitmore & Prance (1987). Dick *et al.* (2007) encontraram em *Ceiba pentandra* a estrutura filogeográfica mais fraca já reportada em espécies tropicais amplamente distribuídas e descartam a ocorrência de eventos vicariantes na espécie.

No presente estudo são apresentados os padrões de distribuição da variabilidade genética e a filogeografia da mungubeira, *Pseudobombax munguba* (Mart. & Zucc.) Dugand na Amazônia brasileira, uma espécie arbórea da família Malvaceae que ocorre exclusivamente ao longo das várzeas amazônicas.

I.1. ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PLANTAS

Fatores que influenciam os padrões de trocas genéticas dentro e entre populações afetam diretamente a estruturação genética das populações de plantas (Schaal *et al.*, 1998; Gribel, 2003). Um desses fatores é o sistema de cruzamento (Ritland, 1983; Murawski & Hamrick, 1991), sendo possível encontrar desde casos em que ocorre fluxo gênico entre populações de espécies divergentes (espécies do gênero *Quercus*, Ferris *et al.*, 1993), até plantas que se reproduzem exclusivamente por apomixia (*Taraxacum officinale*, Schaal *et al.*, 1998).

Outro fator importante é o mecanismo pelo qual os genes migram. O fluxo gênico em plantas ocorre principalmente de duas formas: por meio de movimento de sementes ou de pólen (Ennos, 1994; McCauley, 1994). As plantas apresentam uma grande variedade de mecanismos de polinização e dispersão, levando a padrões diversos de trocas genéticas que são influenciados por variação espacial e temporal nos sistemas de cruzamento. Assim, padrões de trocas genéticas em plantas resultam de uma complexa interação entre sistema reprodutivo e padrões de dispersão (Hamrick, 1987; Hamrick & Godt, 1990; Schaal *et al.*, 1998).

Estudos têm mostrado que espécies de plantas tropicais mantêm uma grande diversidade genética e que a maior parte da variação genética intraespecífica é encontrada dentro das populações (Buckley *et al.*, 1988; Powell *et al.*, 1995; Aldrich *et al.*, 1998; Collevatti *et al.*, 2001; Lemes *et al.*, 2003; Novick *et al.*, 2003), embora Caicedo & Schaal (2004) tenham encontrado altos níveis de variação tanto dentro quanto entre populações de *Solanum pimpinellifolium*. Devido à dispersão somente via semente espera-se encontrar

uma diferenciação ainda maior entre as populações de plantas quando são utilizados marcadores de herança materna (Ennos, 1994; Powell *et al.*, 1995; Ennos *et al.*, 1999; Lira *et al.*, 2003).

Modelos clássicos de genética de populações que descrevem a estruturação genética de populações de plantas assumem que a atual estrutura genética reflete um equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico (Wright, 1951). Contudo, a troca genética é restrita em muitos grupos, tanto pela larga distribuição geográfica da espécie, quanto por limitada dispersão de pólen e/ou sementes (Ehrlich & Raven, 1969). Nesses casos, eventos históricos, como expansão, fragmentação e efeito gargalo, serão fortes fatores determinantes da estrutura genética atual dessas populações (Schaal *et al.*, 1998; Hewitt, 2000; Avise, 2000).

I.2. FILOGEOGRAFIA

Métodos filogeográficos proporcionam os meios de se examinar padrões de distribuição de variação genética, com o potencial de distinguir aqueles causados por fluxo gênico atual entre as populações, daqueles derivados de eventos históricos. Extinção e recolonização, efeito gargalo e efeito fundador são alguns dos tipos de eventos históricos que deixam sinais genéticos nas gerações subsequentes (Hewitt, 1996, Schaal *et al.*, 1998; Dutech *et al.*, 2003).

Alterações climáticas ocorridas no passado (Bennet, 1997; Webb *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1998; Hewitt, 2000), embora mais fracas nos trópicos que nas latitudes temperadas (Dynesius & Jansson, 2000), teriam afetado não só a distribuição geográfica de muitas espécies das florestas tropicais (Prance, 1982; Granville, 1988; Rull, 1998; Pennington *et al.*, 2000), mas também a distribuição da diversidade genética entre as populações dessas espécies (Dutech *et al.*, 2003). Existe atualmente considerável interesse em reconstruir a história dessas espécies visando determinar suas origens e suas respostas a essas alterações (Schaal *et al.*, 1998; Hewitt, 2000, 2004; Cavers *et al.*, 2003; Dutech *et al.*, 2003; Dick *et al.*, 2003; Dick *et al.*, 2007).

Alguns estudos filogeográficos com *Pinus hartwegii* (Matos & Schaal, 2000), com *Dioscorea bulbifera* (Terauchi *et al.*, 1991), com pinheiros (Hong *et al.*, 1993) e com *Streptanthus glandulosus* (Mayer & Soltis, 1994) mostraram que as populações dessas espécies estão geneticamente isoladas há muito tempo. Em outros casos, pouca ou nenhuma variação genética é encontrada, um padrão esperado quando ocorre rápida

expansão a partir de um refúgio, como observado em espécies de regiões temperadas bastante afetadas pelos efeitos das glaciações, como observado em *Fagus sylvatica* (Demesure *et al.*, 1996) e em *Heuchera* (Soltis *et al.*, 1997). Em *Gliricidia* (Lavin *et al.*, 1991) a larga distribuição de um único haplótipo ao longo da distribuição da espécie reflete uma história de dispersão muito mais rápida, provavelmente realizada por humanos. A distribuição geográfica da variação genética encontrada por Petit *et al.* (2002) indica uma grande influência tanto de glaciações quanto de manejo humano, recente e no passado, nas oito espécies do gênero *Quercus* estudadas.

Estudos filogeográficos com espécies de plantas na região neotropical não são muitos se comparados às regiões temperadas. Olsen & Schaal (1999) e Olsen (2002) realizaram estudos com *Manihot esculenta* no norte e centro-oeste do Brasil, encontrando uma estrutura filogeográfica que pode ser explicada pelas alterações climáticas após a última grande glaciação e sugerem um centro de domesticação da espécie no estado de Rondônia.

Caron *et al.*, (2000) encontraram um padrão de distribuição da diversidade genética em *Dicorynia guianensis* que pôde ser relacionado a eventos históricos ocorridos durante o Quaternário na Guiana, onde possivelmente houveram colonizações a partir de vários refúgios diferentes.

Lira *et al.* (2003) mostraram que as populações de *Caesalpinia echinata* no sudeste e nordeste do Brasil apresentam um padrão de isolamento devido à existência de refúgios separados durante as glaciações e de uma forte ação de deriva genética no período pós-glacial. Collevatti *et al.* (2003) também encontraram indícios da existência de refúgios separados para *Caryocar brasiliense* no centro-oeste e sudeste do Brasil, entretanto, alterações no padrão de dispersão das sementes tiveram um papel importante na filogeografia dessa espécie.

Cavers *et al.* (2003) encontraram evidências de repetidas colonizações de *Cedrela odorata* na América Central a partir de populações diferenciadas da América do Sul, após a elevação do Istmo do Panamá.

Dick *et al.* (2003), em um estudo filogeográfico com populações de *Symphonia globulifera* localizadas na América Central, Amazônia e África, atribuíram a expansão da

espécie entre continentes à dispersão marinha, a diferenciação regional encontrada, principalmente na América Central, à heterogeneidade geográfica local e a ausência de variação entre as populações localizadas na bacia Amazônica a uma expansão recente da espécie na região ou a um extensivo fluxo gênico atual. Segundo Dick *et al.* (2003), a distribuição dos haplótipos encontrados nas populações de *Symphonia globulifera* coincide com as zonas biogeográficas propostas por Whitmore & Prance (1987). A existência de três refúgios diferentes na América Central durante as glaciações e a heterogeneidade geográfica da região após a última glaciação, aliadas a efetividade dos Andes como barreira ao fluxo gênico explica a grande estruturação filogeográfica encontrada entre as populações da América Central e oeste do Equador, em contraste com a ausência de variação entre as populações da Amazônia e Guiana. Outras possibilidades seriam a expansão recente da espécie na Amazônia e Guiana ou um extenso fluxo gênico contemporâneo entre as populações dessa região.

Dutech *et al.* (2003) encontraram evidências de que os quatro refúgios sugeridos por Granville (1988) foram de grande importância para a manutenção da diversidade de *Vouacapoua americana* na Guiana Francesa, devido aos eventos de extinção e recolonização decorrentes das alterações climáticas durante o Pleistoceno e Holoceno.

González-Rodríguez *et al.* (2004) observaram no México que as espécies *Quercus affinis* e *Q. laurina* não ficaram restritas a uma ou poucas sub-regiões durante o último ciclo glacial. Os dados obtidos pelos autores indicam a persistência de um número considerável de populações ao longo de vários episódios de alterações climáticas durante o Quaternário, os quais experimentaram recorrentes migrações latitudinais e altitudinais.

Caicedo & Schaal (2004) sugerem que a diferenciação encontrada entre populações de *Solanum pimpinellifolium* é mantida por fluxo gênico restrito e que a distribuição atual da espécie é decorrente de uma gradual colonização ao longo da Costa do Pacífico a partir de um centro de origem no Peru.

Cloutier *et al.*, (2005), estudando o efeito da dispersão hidrocórica em *Carapa guianensis* na bacia Amazônica, encontraram uma forte estrutura populacional regional e discutem a influência de algumas hipóteses biogeográficas na filogeografia da espécie.

Lorenz-Lemke *et al.* (2005) encontraram indícios no Rio Grande do Sul que *Passiflora elegans*, além de ter passado recentemente por um efeito gargalo, teria se originado de uma linhagem de *P. actinia*. A constituição genética de um híbrido natural, originado após um contato secundário entre as duas espécies, sugere que a herança dos plastídios nessas espécies é paterna. Os dados encontrados mostram que ambas as espécies foram afetadas pelas alterações climáticas durante o Quaternário.

Miller & Schaal (2005) encontraram evidências de múltiplos eventos de domesticação de *Spondias purpurea* a partir de linhagens selvagens da espécie na América Central e que populações domesticadas são um importante reservatório de variação genética da espécie.

Dick *et al.* (2007) encontraram tão pouca variação entre indivíduos de *Ceiba pentandra* na América do Sul, América Central e África, que descartam a ocorrência de eventos vicariantes (Gondwana, Boreo-tropical e Andina) na espécie, atribuindo sua ampla expansão geográfica a eventos de dispersão a longas distâncias por vento ou correntes marinhas.

I.3. HIPÓTESES BIOGEOGRÁFICAS - AMAZÔNIA

O amplo debate sobre a influência de alterações climáticas e outras perturbações ambientais nas florestas neotropicais, levou à formulação de algumas hipóteses para explicar as origens da alta biodiversidade encontrada na Amazônia (Bush, 1994; Colinvaux *et al.*, 1996; Morroig & Cerqueira, 1997; Willis & Whittaker, 2000). Entre elas destacam-se: rios como barreiras (Wallace, 1849; Sick, 1968; Capparella, 1988; Ayres & Clutton-Brock, 1992; Haffer, 1992; Patton *et al.*, 1994); a teoria dos refúgios (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970; Cerqueira, 1982; Prance, 1982); centros de origem e dispersão (Hershkovitz, 1977; Reig, 1984); gradientes ecológicos (Endler, 1977, 1982; Patton *et al.*, 1994); vicariância geotectônica (Platnick & Nelson, 1978; Cracraft & Prum, 1988; Futuyma, 1992; Amorim & Pires, 1996); lago amazônico (Klammer, 1984); e dinâmica dos rios (Salo *et al.*, 1986).

Segundo a hipótese dos rios como barreiras, o desenvolvimento do extenso sistema fluvial Amazônico, graças ao soerguimento dos Andes durante o Cenozóico, iniciou uma série de eventos vicariantes devido à fragmentação na distribuição de espécies ancestrais amplamente distribuídas previamente (Morroig & Cerqueira, 1997).

A teoria dos refúgios, ou vicariância ecológica postula que ciclos de alterações climáticas durante o Terciário e o Pleistoceno, alternando entre períodos secos-frios e úmido-quentes, associados respectivamente aos períodos glacial e inter-glacial, resultaram em repetidos eventos de fragmentação em refúgios seguidos de expansão das florestas tropicais, acontecendo o inverso com os tipos de vegetação aberta e sua fauna associada (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970).

A hipótese dos centros de origem e dispersão consiste na existência de áreas biogeográficas estáveis, os centros de origem, a partir dos quais ocorre dispersão através da transposição de uma barreira pré-existente, causando fragmentações simultaneamente (Hershkovitz, 1977; Reig, 1984).

A hipótese dos gradientes ecológicos sugere que os padrões atuais de distribuição são consistentes com a divergência geográfica e adaptações aos fatores eco-geográficos atuais, independente dos fatos históricos (Morroig & Cerqueira, 1997). O isolamento por distância permite adaptações genéticas a diferentes áreas, resultando em zonas uniformes em frequências genéticas ou fenotípicas separadas por clinas (Endler, 1982).

A vicariância geotectônica relaciona princípios cladistas e eventos geotectônicos da Terra (Platnick & Nelson, 1978). Diferentemente da teoria dos refúgios, essa hipótese enfatiza eventos mais antigos, do Terciário ou anteriores (Morroig & Cerqueira, 1997).

A hipótese da dinâmica dos rios sugere que a erosão lateral e alterações na calha dos rios criam e destroem muitos habitats diferentes devido à própria erosão e deposição de materiais nas planícies alagadas, influenciando a criação e manutenção de diversidade de espécies na Amazônia (Salo *et al.*, 1986).

A hipótese do lago amazônico sugere que as oscilações climáticas ocorridas durante o Terciário e o Quaternário tiveram papéis globais, levando à elevação de até 180 m (“The Great Fouaratian transgression” - Klammer, 1984) e redução de até 100-130 m (“Würmian maximum” - Irion, 1984) do nível dos oceanos em relação ao nível atual. Essas alterações teriam causado diferenças na inclinação dos leitos dos rios em relação à inclinação atual, alterando a vazão e a força da erosão lateral dos rios. Com a elevação do nível dos oceanos, as águas marítimas poderiam tanto avançar continente adentro quanto represar a

saída das águas fluviais, causando o extravasamento de muitos rios gerando um grande lago na Amazônia (Klammer, 1984; Morroig & Cerqueira, 1997).

A história geológica, climática e biogeográfica da América do Sul é complexa e muito dinâmica e talvez nenhum modelo consiga sozinho explicar a enorme diversidade das espécies nesta região, mas a combinação de diferentes hipóteses pode ajudar a esclarecer a história evolutiva e a distribuição das espécies amazônicas (Morroig & Cerqueira, 1997).

I.4. MARCADORES MOLECULARES

Devido ao status haplóide, a taxa reduzida de mutação e a falta de recombinação, os genomas de organelas, mitocondrial (mtDNA) e de cloroplasto (cpDNA), apresentam uma menor diversidade em suas seqüências gênicas se comparados ao genoma nuclear e são mais afetados pela seleção por efeito carona. Devido aos baixos níveis de variação nas seqüências, para se encontrar níveis úteis de variação intraespecífica deve-se procurar regiões mais mutáveis, como regiões não codificadoras, mas ainda assim a taxa de mutação é lenta para evidenciar eventos evolutivos muito recentes (Ennos *et al.*, 1999).

Em animais, a maior parte dos estudos filogeográficos envolvem análises de DNA mitocondrial primariamente ou exclusivamente (Awise, 1998). Entretanto, o mtDNA em plantas apresenta uma taxa de substituição muito baixa que, combinada com as freqüentes recombinações intramoleculares, reduzem sua utilidade como fonte de marcadores, sendo utilizado mais freqüentemente o genoma do cloroplasto (Awise, 1998; Provan, 1999; Petit & Vendramin, 2007).

Para uma abordagem filogenética, apenas os dados de substituição de bases e inserções/deleções dentro de regiões não codificadoras do DNA de organelas e do genoma nuclear são satisfatórios (Schaal *et al.*, 1998). Isso porque a taxa de substituição de bases é baixa o suficiente para que não ocorram homoplasias, e a taxa de geração de inserções/deleções não é tão freqüente, o que impossibilitaria o alinhamento das seqüências (Ennos *et al.*, 1999). Em contraste, todos os outros marcadores (como diferenças em números de repetições de genes no cloroplasto e regiões de seqüências simples repetidas) geram homoplasias ou variantes cujas relações evolutivas não podem ser inferidas (Palmer, 1992; Demesure *et al.*, 1996).

Esses fatores impõem limites no uso de marcadores do genoma do cloroplasto para análises filogenéticas intra-específicas em plantas. Entretanto, por seu padrão de herança uniparental, predominantemente materna em angiospermas (Harris & Ingram, 1991), e modelos de evolução, essa molécula possui a capacidade de sinalizar eventos históricos como migrações, dispersão de sementes e hibridização que não poderiam ser obtidos apenas com marcadores nucleares (Ennos *et al.*, 1999). Entretanto, a soma de dados obtidos de vários marcadores, com padrões de herança e taxas evolutivas diferentes, fornece informações mais completas e úteis na elucidação da história evolutiva da espécie estudada (Harris & Ingram, 1991; Schaal *et al.*, 1998).

Entre os marcadores moleculares mais utilizados em estudos genéticos de plantas estão as seqüências simples repetidas-SSR (Powell *et al.*, 1995; Collevatti *et al.*, 1999; Lemes *et al.*, 2002; Provan *et al.*, 2001; Collevatti *et al.*, 2001; Lemes *et al.*, 2003; Collevatti *et al.*, 2003; Novick *et al.*, 2003; Lira *et al.*, 2003), o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição obtidos via reação em cadeia da polimerase PCR-RFLP (El Mousadick & Petit, 1996; Soltis *et al.*, 1997; King & Ferris, 1998; Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Caron *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2002; Cavers *et al.*, 2003; Dutech *et al.*, 2003; González-Rodríguez *et al.*, 2004; Cottrell *et al.*, 2005) e as seqüências de nucleotídeos de segmentos da molécula de DNA nuclear e de cloroplasto (Oxelman *et al.*, 1997; Olsen & Schaal, 1999; Olsen, 2002; Collevatti *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2003; Dick *et al.*, 2003; Caicedo & Schaal, 2004; Miller & Schaal, 2005; Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Dick *et al.* 2007).

Os marcadores de DNA microssatélites, também conhecidos como Sequências Simples Repetidas (SSR), são pequenas seqüências de 1 a 6 nucleotídeos repetidas em tandem, muito freqüentes e distribuídas ao acaso por todo o genoma dos eucariotos (Tautz & Renz, 1984; Litt & Luty, 1989). Normalmente apresentam locos altamente polimórficos, com alta diversidade alélica, são co-dominantes, e de grande conteúdo informativo (Morgante & Olivieri, 1993; Condit & Hubbell, 1991; Powell *et al.*, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998). As seqüências flanqueadoras das regiões dos microssatélites são conservadas entre espécies relacionadas, o que torna possível a transferência de marcadores entre espécies ou mesmo entre gêneros usando pares de iniciadores heterólogos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Por suas características, os microssatélites apresentam um alto poder de discriminação individual, o que os torna uma poderosa

ferramenta em estudos sobre estrutura genética populacional, fluxo gênico e análise de parentesco (Rafalski *et al.*, 1996; Chase *et al.*, 1996).

A descoberta de SSR polimórficas, no genoma de cloroplasto (cp-SSR) forneceu uma ferramenta de alta resolução para utilização da molécula de cloroplasto em genética de populações, contornando o problema dos baixos níveis de variabilidade encontrados neste genoma (Ennos *et al.*, 1999; Provan, 1999; 2001). Como o genoma de cloroplasto apresenta herança materna na maioria das angiospermas, os microssatélites de cloroplasto evidenciam o fluxo gênico que ocorre por meio de dispersão de sementes. Por ser haplóide, o tamanho efetivo de população para o genoma do cloroplasto é metade do tamanho efetivo para o genoma nuclear, assim, microssatélites de cloroplasto são bons indicadores de eventos históricos como efeito gargalo, efeito fundador e deriva genética (Ennos *et al.*, 1999; Provan, 1999; 2001; Petit & Vendramin, 2007).

Polimorfismos no comprimento de fragmentos obtidos por quebra da fita de DNA por enzimas de restrição (RFLPs) foram utilizados pela primeira vez para detecção de mutações em vírus (Godzicker *et al.*, 1974). Amplamente utilizada para acessar variação na seqüência de nucleotídeos tanto de regiões codificadoras quanto não codificadoras, essa técnica possui expressão co-dominante além de apresentar altos níveis de polimorfismo. PCR-RFLP, ou CAPS (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequences”) é uma técnica desenvolvida a partir do RFLP e também consiste na obtenção de polimorfismos em comprimentos de fragmentos de DNA por enzimas de restrição. Entretanto, os fragmentos são obtidos pela digestão do produto previamente amplificado de um segmento de DNA de interesse utilizando reação em cadeia da polimerase (Saiki *et al.*, 1985). A utilização de várias enzimas de restrição combinadas possibilita encontrar altos níveis de polimorfismos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Essa tem sido, até o momento, a técnica mais comumente utilizada em estudos filogeográficos com plantas, tanto em regiões temperadas quanto tropicais (El Mousadik & Petit, 1996; Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Soltis *et al.*, 1997; King & Ferris, 1998; Petit *et al.*, 2002; Cavers *et al.*, 2003; Dutech *et al.*, 2003; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2004; Cottrell *et al.*, 2005).

Outra forma de detectar variação útil para estudos genéticos é a busca de polimorfismos diretamente nas seqüências de nucleotídeos em regiões específicas do DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Locus distintos na mesma molécula apresentam modelos e tempos de evolução diferentes, como os genomas nuclear e citoplasmático que, além disso,

apresentam tipos de herança diferentes. Esse fato permite a utilização de seqüências específicas de DNA em vários tipos de estudos. Segmentos que apresentam uma taxa de evolução lenta podem ser utilizados para reconstruir a relação filogenética de taxa superiores. Uma taxa de evolução média é útil para inferir relações entre grupos mais próximos. Para a resolução de questões evolutivas de grupos intimamente relacionados, ou até questões populacionais intra-específicos, devem ser utilizados segmentos com uma alta taxa de evolução (Schaal *et al.*, 1998; Ennos *et al.*, 1999; Provan, 1999, 2001).

Existem ainda poucos estudos utilizando seqüências de nucleotídeos para investigar a filogeografia em plantas tropicais. Na maioria dos estudos realizados foram utilizadas seqüências de regiões não codificadoras do genoma de cloroplasto, como em *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al.*, 2003), duas espécies do gênero *Passiflora* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005) e *Spondias purpurea* (Miller & Schaal, 2005). Destacam-se ainda os estudos com *Manihot esculenta* (Olsen & Schaal, 1999; Olsen, 2002), *Symphonia globulifera* (Dick *et al.*, 2003), *Solanum pimpinellifolium* (Caicedo & Schaal, 2004) e *Ceiba pentandra* (Dick *et al.* 2007) que além de seqüências do DNA do cloroplasto, também investigaram seqüências do genoma nuclear.

I.5. CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO PSEUDOBOMBAX

A família Malvaceae *sensu lato* compreende as subfamílias Grewioideae, Byttnerioideae, Sterculioideae, Tilioideae, Dombeyoideae, Brownlowioideae, Helicteroideae, Malvoideae e Bombacoideae. Diversos estudos utilizando marcadores moleculares têm confirmado que esse clado é monofilético (Alverson *et al.*, 1998; Alverson *et al.*, 1999; Bayer *et al.*, 1999; Baum *et al.*, 2004). Análises de seqüências de genes plastidiais realizadas por Alverson *et al.* (1999) e Bayer *et al.* (1999) mostraram que as subfamílias Bombacoideae e Malvoideae são intimamente relacionadas, formando um grupo monofilético, denominado Malvatheca (Baum *et al.*, 1998). No entanto, a composição e as relações, entre alguns taxa dentro desse grupo continuam incertas.

A subfamília Malvoideae possui uma distribuição basicamente subtropical e temperada e consiste em cerca de 1700 espécies, constituindo a maior parte da diversidade de espécies do grupo Malvatheca. Relativamente pequena, a subfamília Bombacoideae contém menos de 250 espécies, sendo predominantemente composta de árvores tropicais (Baum *et al.*, 2004). Segundo Baum *et al.* (2004), ambas subfamílias teriam se originado

na América do Sul e a grande diferença em número de espécies entre as duas subfamílias seria resultado de uma radiação das Malvoideae nas regiões subtropical e temperada, a partir de uma fonte tropical menos diversa.

A subfamília Bombacoideae compreende a maioria dos gêneros que faziam parte da antiga família Bombacaceae, menos *Durioneae* e acrescida de *Fremontodendrae* (Bayer *et al.*, 1999), e é um dos poucos grupos de Angiospermas em que a polinização por vertebrados, principalmente por morcegos, prevalece sobre a polinização por insetos (Gribel, 1988; 1995).

Pseudobombax é um gênero exclusivamente neotropical, com 20 espécies de árvores e arbustos, que ocorre do norte da Argentina, Paraguai e Brasil à América Central (Robyns, 1963; Aubréville, 1975). As espécies de *Pseudobombax* são geralmente especializadas em colonizar habitats abertos com algum tipo de restrição no solo para outras espécies arbóreas, como longos períodos de alagamento (Gribel, 1995).

I.6. MORFOLOGIA, BIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE *PSEUDOBOMBAX MUNGUBA*

Pseudobombax munguba (Mart. & Zucc.) Dugand é uma espécie arbórea que pode atingir até 40 metros de altura, é decídua e renova sua folhagem durante o período entre o surgimento das flores e a maturação dos frutos, aproximadamente de junho a setembro (Gribel, 1995). Na maioria das espécies do gênero *Pseudobombax* as flores apresentam estrutura robusta, tamanho grande e centenas de estames formando um tufo semi-esférico ou em forma de pincel (Robyns 1963; Gribel, 1988). Em *P. munguba* as flores são solitárias, inclinadas, grandes (corola com 10-14 cm de diâmetro) e totalmente brancas, incluindo anteras e pólen. As flores de *P. munguba* são polinizadas por uma única espécie de morcego, *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae), um dos maiores morcegos da região neotropical (Gribel & Gibbs, 2002). Esses morcegos possuem uma grande área de forrageio, chegando a cobrir distâncias de 10-20 km por dia (Williams & Williams, 1970). Diferente de todas as outras espécies quiropterófilas, as flores de *P. munguba* não produzem néctar (Gribel, 1995).

Estudos sobre o sistema reprodutivo forneceram evidências de altos níveis de fecundação cruzada em árvores tropicais (O'Malley & Bawa, 1987; O'Malley *et al.*, 1988; Hamrick & Loveless, 1989; Murawski *et al.* 1990; Murawski & Hamrick 1991, 1992; Alvarez-Buylla & Garay, 1994; Hall *et al.*, 1994; Boshier *et al.*, 1995; Alvarez-Buylla *et*

al., 1996; Lemes, 2000, Collevatti *et al.*, 2001; Dick, 2001; White *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2005). Vários autores atribuem a prevalência desses altos níveis de fecundação cruzada a algum tipo de auto-incompatibilidade (Bawa, 1974; Bawa *et al.*, 1985, Bullock, 1985; O'Malley & Bawa, 1987; Murawski *et al.*, 1990). *Pseudobombax munguba* apresenta alta taxa de fecundação cruzada apesar da espécie não apresentar uma barreira de auto-incompatibilidade esporofítica ou gametofítica típica (Gribel & Gibbs 2002). A produção final de sementes, contudo, não é afetada pela redução da fertilidade devido à perda de óvulos auto-fecundados. As sementes são produzidas em grande quantidade através de fertilização cruzada freqüente, promovida por um polinizador capaz de forragear a longas distâncias (Gribel & Gibbs, 2002). Também foi observado que *P. munguba* não apresenta agasmospermia (Gribel & Abbott, 1996).

Os frutos de *P. munguba* são elípticos, com 15 a 30 cm de comprimento e cor vermelha. As cápsulas deiscentes contêm 500-2700 pequenas sementes (2-3 mm de diâmetro), que pesam 19-32 mg cada. A maturação dos frutos ocorre de 55 a 75 dias após a abertura das flores (Gribel, 1995). As sementes são envolvidas por uma fibra macia e leve que ajuda na dispersão pelo vento. Essa fibra é bastante utilizada pelas populações locais na confecção de traveseiros.

P. munguba é a única espécie do gênero que ocorre nas florestas de várzea, podendo ser encontrada em áreas sazonalmente inundadas por até quatro meses e nas várzeas de maré, na região do estuário amazônico (Pires, 1974; Pires & Prance, 1985; Worbes, 1992; Gribel & Gibbs, 2002; Gribel, 2003). Os habitats alagáveis chamados de várzea são característicos das bacias sedimentares dos rios de água branca. O nome água branca se refere aos rios da Amazônia que têm suas cabeceiras nos Andes. A forte erosão nos Andes fornece o sedimento encontrado nestes rios, dando às águas uma aparência barrenta. Os rios de águas brancas possuem alta carga de sedimento, pH quase neutro e condutividades elétricas relativamente altas (Araujo-Lima & Goulding, 1998).

P. munguba também pode ser encontrada nas áreas alagadas do Rio Branco no estado de Roraima. O Rio Branco é um afluente do Rio Negro que sazonalmente carrega sedimentos originados dos Tepuis, dando às suas águas uma aparência semelhante aos rios de água branca (Araujo-Lima & Goulding, 1998).



Figura 1 - Indivíduos adultos de *P. munguba*: A) Em terra; B) Parcialmente submersa; C) Totalmente submersa.

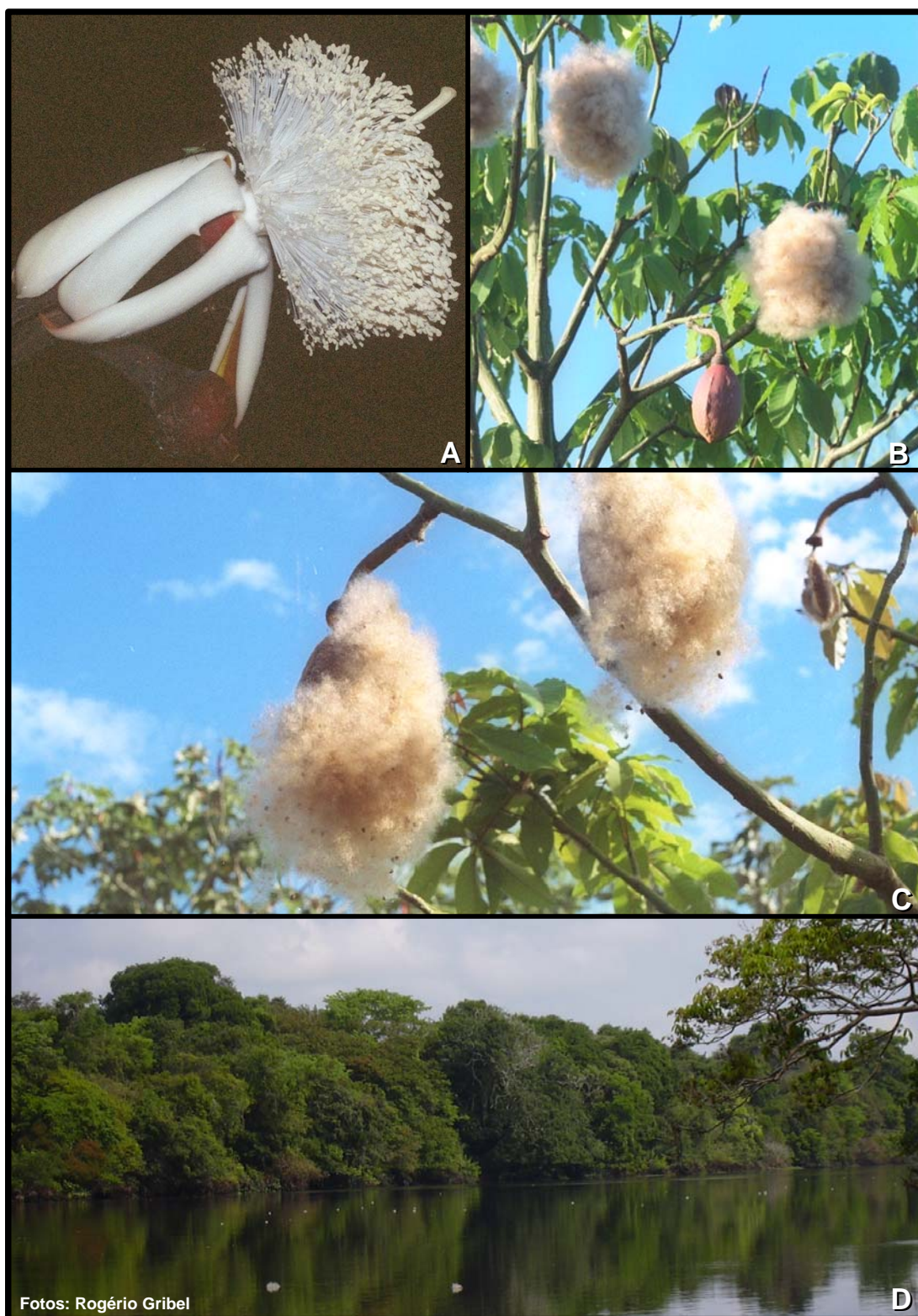


Figura 2 - Flor, frutos, sementes e dispersão de *P. munguba*. A) Flor; B) Frutos e sementes; C e D) Dispersão de sementes.

I.7. PSEUDOBOMBAX MUNGUBA E A VÁRZEA

A presença de grandes florestas nas planícies alagáveis dos rios de águas barrentas da Amazônia leva a uma grande disponibilidade de frutas e sementes que são uma importante fonte de alimento para vários tipos de peixes e outros animais. As larvas de caraciformes como o tambaqui e de espécies dos gêneros *Triporthus*, *Brycon* e *Chalceus*; de várias espécies de piranha; de aracus ou piaus (Anostomidae) e de bagres (Pimelodidae, Doradidae e Auchenipteridae), após deixarem os rios de águas barrentas, entram na planície inundada onde começam a se alimentar (Araujo-Lima & Goulding, 1998). Claro-Jr *et al.* (2004) observaram, em juvenis de *Parauchenipterus galeatus*, *Mylossoma duriventre* e *Triporthus elongatus*, uma dieta composta basicamente de frutos e sementes. O mesmo foi observado por Balensiefer & Vogt (2006) em tartarugas da espécie *Podocnemis unifilis*. As sementes de *P. munguba*, ricas em proteínas e óleos, são efetivamente importantes para as populações nativas de peixes e tartarugas nas áreas de várzea (Gribel, 1995).

Na várzea dos rios Solimões e Amazonas, *P. munguba* ocorre em densidades de cinco árvores por hectare (Araujo-Lima & Goulding, 1998). Uma árvore produz em média 55 frutos por ano, contendo 1.474 sementes cada (Gribel, 1995). Considerando cerca de 1,2 kg de sementes por árvore, a produção total de sementes de munguba foi estimada em cerca de 78.000 t/ano na várzea do rio Amazonas (Araujo-Lima & Goulding, 1998).

O impacto das ações antrópicas nas áreas de várzea vem aumentando ao longo dos anos (Monteiro & Sawyer, 2001). Embora *P. munguba* seja ainda bastante abundante na Amazônia, a derrubada da mata, seja para exploração de madeira ou para agricultura, pode causar uma redução da densidade populacional da espécie. Essa redução pode resultar na diminuição do fluxo gênico e o aumento dos níveis de auto-fecundação, diminuindo a produção total de sementes com impactos negativos na população de *P. munguba*, na ictiofauna e em outros grupos tróficos que também dependem da oferta de alimentos nesse ambiente (Gribel, 1995; Claro-Jr, 2004).

Essa ameaça à manutenção da biodiversidade é resultado da redução de diversidade genética que compromete a viabilidade das populações, tornando importantes a detecção e a quantificação dos níveis naturais da variação genética em populações, principalmente de

espécies de árvores ameaçadas (Bawa, 1993; Alvarez-Buylla *et al.*, 1996; Lemes *et al.*, 2003).

I. 8. JUSTIFICATIVA

Baseado nas informações expostas anteriormente, o presente trabalho objetiva investigar a filogeografia e a estrutura genética de populações de *P. munguba*, informações indispensáveis para se propor estratégias de conservação para essa espécie tão importante nas várzeas amazônicas.

Além disso, obter conhecimento dos níveis e padrões de distribuição espacial da variabilidade genética de espécies florestais ao longo da Amazônia é uma questão atual muito relevante uma vez que o entendimento dos padrões evolutivos, inter e intra-populacionais, fornece subsídios importantes para a elucidação não só da história de colonização da planta mas também serve de contribuição na discussão da história evolutiva e geológica da própria Amazônia.

II. OBJETIVOS

Investigar a filogeografia e a estrutura genética de populações da Mungubeira (*Pseudobombax munguba*), uma importante espécie arbórea das várzeas amazônicas, por meio da análise de polimorfismos de seqüências e locos microssatélites do genoma do cloroplasto.

Objetivos específicos:

a) Quantificar a diversidade genética em populações de *P. munguba* utilizando marcadores microssatélites e seqüências de regiões não-codificadoras do genoma de cloroplasto;

b) Caracterizar e comparar os padrões de distribuição da variabilidade genética e os níveis de diferenciação genética entre as populações de *P. munguba*, na Amazônia brasileira, com base na análise de polimorfismos de seqüências de uma região não-codificadora e de locos microssatélites do genoma do cloroplasto;

c) Relacionar as diversas hipóteses biogeográficas da Amazônia com os padrões de distribuição da diversidade de haplótipos encontrados no genoma de cloroplasto de *P. munguba* na Amazônia brasileira.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. MATERIAL BIOLÓGICO E LOCAIS DE COLETA

No total foram amostrados 162 indivíduos de *P. munguba* pertencentes a 11 populações distribuídas na Amazônia brasileira (Tabela 1 e Figura 3). As populações foram definidas como grupos de árvores com potencial contato reprodutivo entre si, geograficamente relacionadas, ocorrendo num raio de 5 km (cerca de 78 km²). As populações amostradas estão separadas por distâncias superiores a 140 km ou por grandes rios. Foram amostrados de 16 a 43 indivíduos por população nas seguintes localidades: 1) Beruri-AM; 2) Caracará-RR; 3) Catalão, Manaus-AM; 4) Cruzeiro do Sul-AC; 5) Floresta Nacional de Caxiuanã-PA; 6) Rio Japurá-AM; 7) Rio Madeira-AM; 8) Paraná do Mapixí, Rio Purus-AM; 9) Tabatinga-AM (margem direita); 10) Tabatinga -AM (margem esquerda); 11) Tefé-AM.

Tabela 1. Localização das populações e número de indivíduos amostrados de *P. munguba* na Amazônia Brasileira. As colunas N¹ e N² apresentam os números de indivíduos de cada população utilizados nas análises com dados de microssatélites e de regiões não codificadoras do cpDNA, respectivamente.

População	Sigla	N ¹	N ²	Localidade / Rio	Coordenadas geográficas	Altitude (m)
Beruri	B	16	4	Beruri - AM / Purus	3°48'S, 61°26'O	23
Caracará	C	3	3	Caracará - RR / Branco	1°23'S, 61°15'O	49
Catalão	Ca	16	-	Manaus - AM / Amazonas	1°28'S, 60°15'O	22
Caixiuanã	Cx	16	4	Melgaço - PA / Amazonas	1°45'S, 51°28'O	10
Cruzeiro do Sul	CS	15	4	Cruzeiro do Sul - AC / Juruá	7°35'S, 72°54'O	173
Japurá	J	16	4	Japurá - AM / Japurá	1°42'S, 67°14'O	63
Madeira	M	15	4	Borba - AM / Madeira	5°37'S, 60°58'O	32
Paraná do Mapixí	PM	16	4	Tapaua - AM / Purus	5°37'S, 64°00'O	54
Tefé	T	16	4	Tefé - AM / Solimões	3°20'S, 64°42'O	46
Tabatinga - M. Dir.	TD	16	4	Tabatinga - AM / Solimões	4°12'S, 69°51'O	68
Tabatinga - M. Esq.	TE	16	-	Tabatinga - AM / Solimões	4°27'S, 69°55'O	68
Total		161	35			

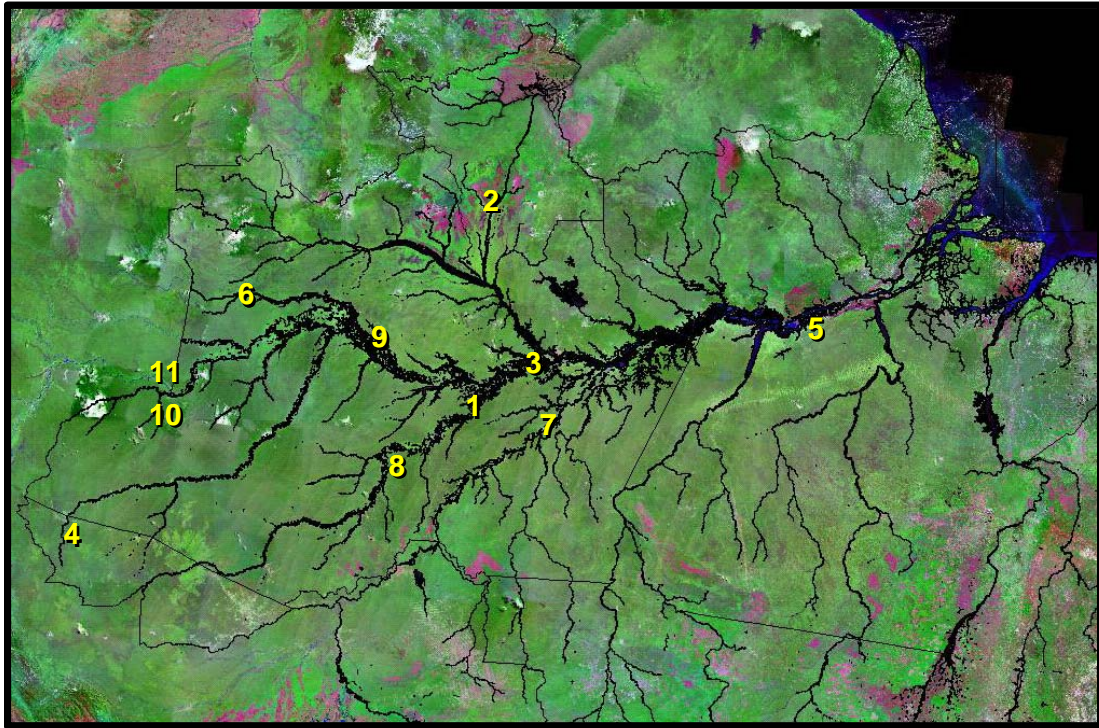


Figura 3 - Locais de Coleta de *P. munguba*. 1) Beruri-AM; 2) Caracaraí-RR; 3) Catalão, Manaus-AM; 4) Cruzeiro do Sul-AC; 5) Floresta Nacional de Caxiuanã-PA; 6) Rio Japurá-AM; 7) Rio Madeira-AM; 8) Paraná do Mapixi, Rio Purus-AM; 9) Tefé-AM; 10) Tabatinga-AM (margem direita); 11) Tabatinga -AM (margem esquerda).

O material biológico utilizado foi tecido vegetal proveniente de folhas ou câmbio, os quais, após a coleta, foram secos, acondicionados em um recipiente contendo sílica gel e armazenados a -20°C no Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas (LabGen) do INPA.

III.2. EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DO DNA

O DNA genômico total foi extraído pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (Doyle & Doyle, 1987), utilizando o protocolo otimizado por Ferreira & Grattapaglia (1998), com auxílio de um disruptor celular FastPrep (Q Biogene, USA) para maceração das amostras.

A quantificação do DNA extraído foi feita por comparação com padrões de massa molecular conhecida (DNA fago Lambda), em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (Ferreira & Grattapaglia, 1998), analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultra-pura e padronizadas a uma concentração de $2,5\text{ ng}/\mu\text{l}$.

III.3. AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS LOCOS MICROSSATÉLITES DO GENOMA DO CLOROPLASTO (CPDNA)

Foi testada a transferibilidade para *Pseudobombax munguba* de dez pares de iniciadores (“*primers*”) originalmente desenvolvidos para *Nicotiana tabacum* (Weisinger & Gardner, 1999), os quais amplificam locos microssatélites do genoma do cloroplasto da maioria das angiospermas, e quatro pares desenvolvidos para *Eucalyptus globulus* (Steane *et al.*, 2005). Um dos *primers* de cada par foi marcado com um fluorocromo (FAM, HEX e TET/NED) para permitir a análise em seqüenciador automático de DNA.

A amplificação dos locos microssatélites do cpDNA foi realizada via Reação em Cadeia da Polimerase - PCR num volume total de 10µL contendo 0,4 µM de cada *primer*; 1 unidade de Taq DNA polimerase; 200 µM de cada nucleotídeo (dNTP); tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂); BSA (Bovine Serum Albumin - 2,5 mg/mL); 7,5mM de MgCl₂; 7,5ng de DNA e água ultrapura.

As reações foram realizadas em termociclador PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições: (1) desnaturação inicial a 94°C / 5 min, seguida de 30 ciclos de: (2) desnaturação a 94°C / 1 min; (3) anelamento na temperatura específica de cada par de *primer*/1min, (4) extensão a 72°C / 1 min, e uma etapa de extensão final a 72°C / 45 min.

A amplificação dos locos microssatélites foi confirmada pela análise dos produtos amplificados após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, em transiluminador sob luz ultra-violeta e fotodocumentados. Após, os produtos amplificados foram diluídos e analisados sob eletroforese em gel de poliacrilamida 5% em seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 XL (Applied Biosystems Inc.). Para a estimativa do tamanho dos alelos foram utilizados os padrões internos de peso molecular TAMRA 500 e ROX (ABI). Os dados genéticos foram coletados e analisados utilizando-se os programas Genescan e Genotyper (Applied Biosystems Inc.).

III.4. AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES NÃO CODIFICADORAS DO CPDNA

Foram testados cinco pares de *primers* universais que amplificam regiões não-codificadoras do genoma de cloroplasto das angiospermas, sendo quatro espaçadores intergênicos, 1) *trnH/psbA* (Hamilton, 1999), 2) *trnS/trnG* (Hamilton, 1999) e 3)

psbB/psbF (Hamilton, 1999), 4) *atpB/rbcL* (Samuel *et al.*, 1997), e um intron 5) *rps16* (Oxelman *et al.*, 1997).

A amplificação foi realizada via PCR num volume total de 20µL contendo 1,5 µM de cada *primer*; 2,5 unidades de Taq DNA polimerase; 200 µM de cada nucleotídeo (dNTP); tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂); BSA (Bovine Serum Albumin - 2,5 mg/mL); 23,4mM de MgCl₂; 7,5ng de DNA e água ultrapura.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: (1) desnaturação inicial a 94°C / 4min, seguida de 35 ciclos de: (2) desnaturação a 92°C / 45 seg; (3) anelamento na temperatura específica de cada par de *primer* / 45 seg, (4) extensão a 72°C / 1 min e 30 seg, e uma etapa de extensão final a 72°C / 10 min.

Os produtos amplificados foram analisados sob eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para a confirmação da amplificação. Para a estimativa dos tamanhos dos produtos amplificados foi utilizado padrão *1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

III.5. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Os produtos amplificados das regiões não-codificadoras do cpDNA de *P. munguba* foram purificados utilizando as enzimas *Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (ExoSAP-IT - USB Corporation) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, visando a eliminação de excesso de reagentes que pudessem interferir na qualidade das seqüências.

Os produtos amplificados foram seqüenciados utilizando-se os *primers* nos dois sentidos (*forward* e *reverse*). As reações de seqüenciamento foram realizadas em um volume total de 10 µl com 1,5 µl de um dos *primers* na concentração 2µM, 2 µl do Kit Big Dye Terminator III (Applied Biosystems, Inc.), 2 µl de Tampão de Diluição, 2 µl de PCR e 2,5 µl de água ultra-pura. Em seguida as reações foram purificadas utilizando-se solução de Acetato de Sódio/EDTA (Acetato de Sódio 3M, pH 5,2 e EDTA 125 mM e pH 8.0) e Etanol.

Os produtos contendo a reação de seqüenciamento foram re-suspensos em tampão de carregamento composto por quatro partes de formamida para uma parte de azul dextran,

desnaturados a 95°C/2min e analisados sob eletroforese em gel de poliacrilamida 5% num seqüenciador de DNA ABI 377 (Applied Biosystems, Inc.). As seqüências obtidas foram analisadas no programa Sequencing Analysis 3.4.1 (Applied Biosystems Inc.) e editadas utilizando-se o programa ChromasPro versão 1.34 (Technelysium Pty Ltd). O alinhamento das seqüências obtidas nos dois sentidos (*forward e reverse*) e a criação da seqüência consenso de cada par foram realizadas utilizando-se o programa BioEdit versão 7.0.5.3 (Hall, 1999).

III.6. ANÁLISE DOS DADOS

Para os dados de microssatélites, chamamos de loco cada sitio de cpSSR e de alelo cada variante de tamanho no determinado loco. Para os dados de seqüências chamamos de loco cada sítio variável ao longo das seqüências e de alelo cada variação encontrada em um mesmo loco em diferentes seqüências. Somente substituições nucleotídicas foram consideradas como variações. Como a molécula de cloroplasto normalmente não sofre recombinação, pode ser considerada um único loco e então, tanto para dados de seqüências quanto de microssatélites, cada combinação única de alelos de diferentes locos foi denominada de haplótipo.

Para os locos microssatélites foram calculados: número de locos polimórficos (S), número de alelos por loco, número de haplótipos, freqüência dos haplótipos e a diversidade genética (H_e), que se baseia na probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente serem diferentes (Nei, 1987).

Para as estimativas das distâncias genéticas entre as populações foi utilizada a distância (D), definida por Reynolds *et al.* (1983). Essa distância se baseia em diferenças entre os números de repetições nas regiões de microssatélites seguindo o modelo de evolução de microssatélites em análises intra-específicas: o SMM (Stepwise Mutation Model). Para o teste da hipótese de isolamento por distância, foram correlacionadas as medidas de distância genética (D) e distância geográfica euclidiana (Km) entre as populações de *P. munguba*, par a par, utilizando-se para tal o teste de Mantel (Mantel, 1967) implementado pelo programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2001).

Para determinar a distribuição da variabilidade genética detectada dentro e entre as populações foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) para dados haplotípicos, utilizando-se o programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*

2001). A significância do índice de diferenciação F_{ST} foi testada por meio de 1000 permutações utilizando-se teste não paramétrico, segundo Excoffier *et al.* (1992).

Para os dados de seqüências foram determinadas a variação no comprimento e a composição nucleotídica das seqüências obtidas. As relações entre os haplótipos obtidos a partir da variação nos locos microsatélites, quanto nas seqüências do cpDNA, foram inferidas por meio de uma análise de rede utilizando o método *Median-Joining* (Bandelt *et al.*, 1999), com o programa NETWORK (Forster *et al.* 2000). Esse método combina características do algoritmo de Kruskal, que encontra a melhor árvore por favorecer conexões curtas, com o algoritmo heurístico de máxima parcimônia de Farris e adiciona vértices chamados *median vectors*, que seriam haplótipos extintos ou não amostrados na população (Bandelt *et al.*, 1999).

IV. RESULTADOS

IV.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico total de *P. munguba* foi realizada com sucesso, usando o método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987) e modificado por Ferreira & Grattapaglia (1998). Na figura 4 observa-se a quantificação das amostras de DNA extraído de oito indivíduos de *P. munguba* em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

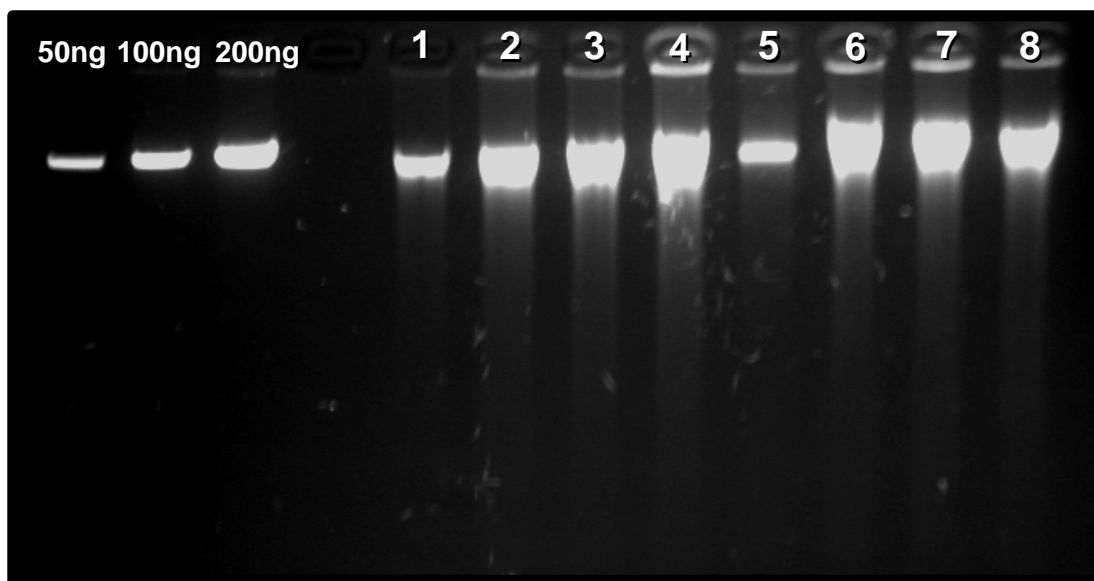


Figura 4 - Quantificação do DNA genômico total extraído de amostras de *P. munguba*. As três primeiras colunas indicam, respectivamente os marcadores de peso molecular 50, 100 e 200 ng. Nas colunas de 1 a 8, as bandas correspondem ao DNA extraído de oito indivíduos de *P. munguba* da população do Rio Madeira - AM.

IV.2. AMPLIFICAÇÃO, GENOTIPAGEM E ANÁLISE DOS LOCOS MICROSSATELITES DO GENOMA DO CLOROPLASTO (CPDNA)

Foram otimizadas as condições de PCR de nove dos 14 pares de *primers* testados que amplificam locos microssatélites do genoma do cloroplasto de espécies de angiospermas (*ccmp1*, *ccmp2*, *ccmp3*, *ccmp4*, *ccmp6*, *ccmp7*, *ccmp10*, *emcrc74* e *emcrc90*) e confirmada a transferabilidade desses marcadores para *P. munguba*. As temperaturas de anelamento otimizadas para cada par de *primers*, o número de alelos encontrados e os tamanhos dos fragmentos estão listadas da tabela 2. Dos nove locos SSR otimizados, oito foram utilizados nas análises genéticas: *ccmp2*, *ccmp3*, *ccmp4*, *ccmp6*, *ccmp7*, *ccmp10*, *emcrc74* e *emcrc90*. A figura 5 mostra diferentes produtos de amplificação a partir da

análise desses oito locos microssatélites, em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Tabela 2 - Características dos oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto amplificados para *Pseudobombax munguba*. T_A: Temperatura de anelamento. Referências: * Weisinger & Gardner, 1999; ** Steane *et al.*, 2005.

cpSSR	Seqüência dos <i>primers</i> 5' - 3'	T _A (°C)	Número de alelos	Tamanho estimado dos fragmentos (pb)
EMCRC74_FAM	6-FAM/GGC CGT GTA CGA GAA GTC AA	56	2	121 a 122
EMCRC74**	CCA AGG GCT ATA GTC ATA GTG ATC C			
EMCRC90_NED	NED/ACA CTA GCC ATT CAG AGT CTA C	56	2	202 a 205
EMCRC90**	ATA GCG ATG GAG TTT TAT GA			
ccmp2_FAM	6-FAMGAT CCC GGA CGT AAT CCT G	58	3	139 a 141
ccmp2*	ATC GTA CCG AGG GTT CGA AT			
ccmp3_HEX	HEX/CAG ACC AAA AGC TGA CAT AG	55	5	134 a 153
ccmp3*	GTT TCA TTC GGC TCC TTT AT			
ccmp4_TET	TET/AAT GCT GAA TCG AYG ACC TA	58	3	230 a 232
ccmp4*	CCA AAA TAT TBG GAG GAC TCT			
ccmp6_FAM	6-FAM/CGA TGC ATA TGT AGA AAG CC	58	4	118 a 121
ccmp6*	CAT TAC GTG CGA CTA TCT CC			
ccmp7_TET	TET/CAA CAT ATA CCA CTG TCA AG	45	3	285 a 287
ccmp7*	ACA TCA TTA TTG TAT ACT CTT TC			
cmp10_HEX	HEX/TTT TTT TTT AGT GAA CGT GTC A	58	3	103 a 132
ccmp10*	TTC GTC GDC GTA GTA AAT AG			

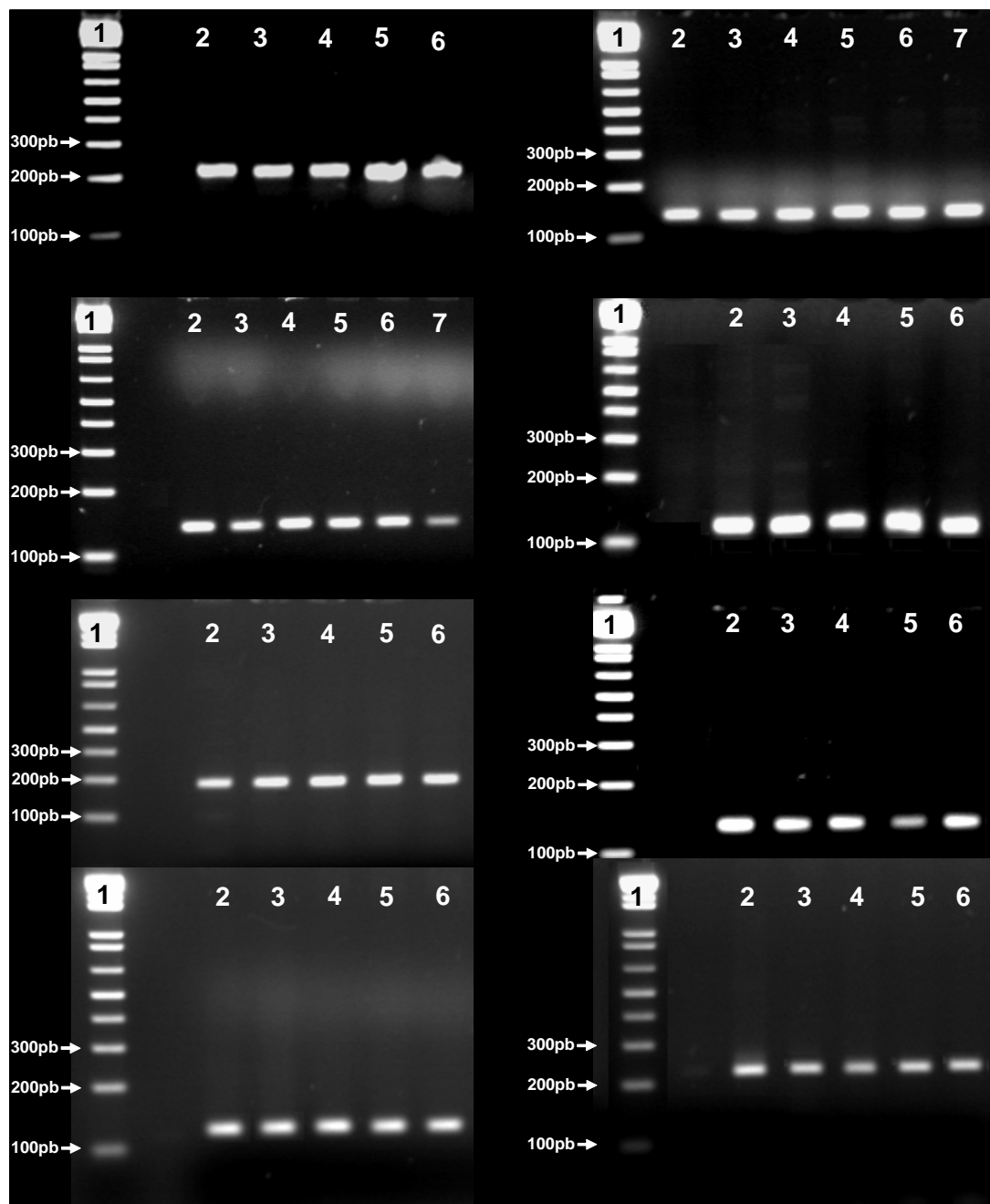


Figura 5 - Fragmentos amplificados a partir da análise de oito locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *P. munguba*. A coluna M apresenta o marcador *1 Kb plus DNA ladder*, as colunas 1 a 6 apresentam fragmentos de DNA amplificados de diferentes indivíduos de *P. munguba*. A) Loco *ccmp2*, B) *ccmp3*, C) *ccmp4*, D) *ccmp7*, E) *ccmp8*, F) *ccmp10*, G) *emcrc74*, H) *emcrc90*.

Os oito locos microssatélites analisados mostraram-se polimórficos. Foram genotipados, com base na análise desses oito locos, um total de 161 indivíduos de *P. munguba* pertencentes a 11 populações amostradas na Amazônia brasileira. Na figura 6 são apresentados eletroferogramas mostrando alelos observados para os oito locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *P. munguba*. Por se tratar de um genoma haplóide, observa-se apenas um alelo por loco analisado. O número total de alelos observado foi 25 sendo que o número de alelos observados por loco variou de 2 a 5 (Tabelas 2 e 3). A análise conjunta dos oito locos microssatélites do cpDNA evidenciou a presença de 35 haplótipos nas 11 populações de *P. munguba*. As frequências dos haplótipos observados e sua distribuição nas populações estão dispostas na figura 7. Dentre os 35 haplótipos detectados, um mostrou-se mais freqüente em relação aos demais (39,75%), ocorrendo em sete populações e 19 foram representados por apenas um indivíduo. A frequência dos outros 34 haplótipos variou de 0,62% a 12,42% (Figura 7). Três populações (Beruri, Catalão e Caxiuanã), todas situadas na calha central dos rios Solimões e Amazonas mostraram-se monomórficas, ou seja, não apresentaram variação em nenhum dos locos microssatélites analisados.

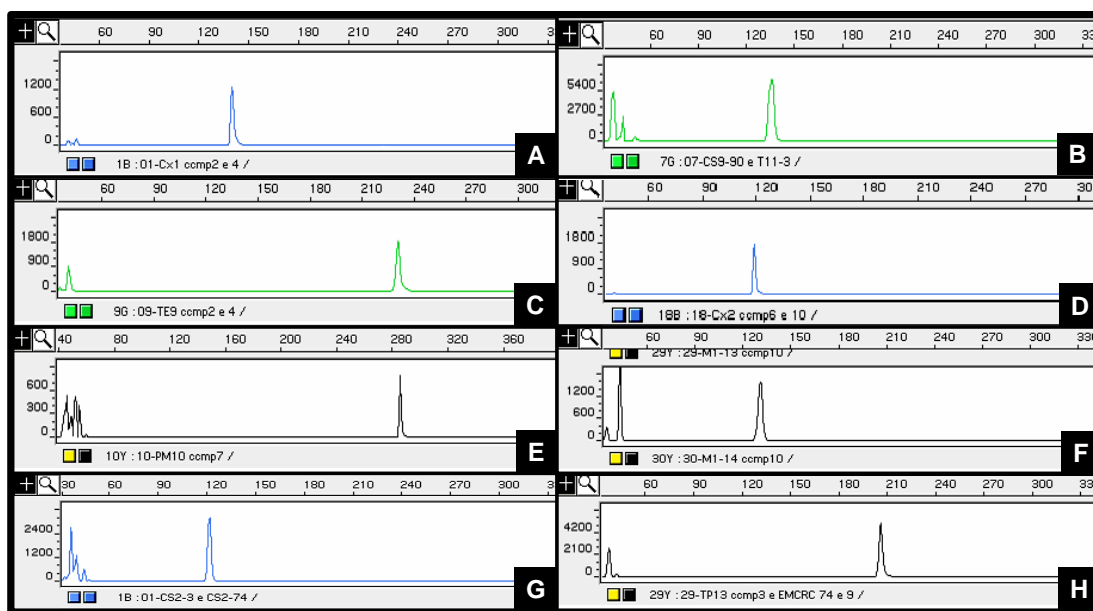


Figura 6 - Eletroferogramas mostrando alelos de oito locos microssatélites do cpDNA amplificados para diferentes indivíduos de *P. munguba*. Cada pico indica um alelo. Os tamanhos dos alelos encontram-se indicados na barra superior, em pares de bases. A) Loco *ccmp2*, B) *ccmp3*, C) *ccmp4*, D) *ccmp7*, E) *ccmp8*, F) *ccmp10*, G) *emcrc74*, H) *emcrc90*.

Tabela 3 - Haplótipos observados com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto, em 11 populações de *Pseudobombax munguba*. N = numero de indivíduos.

Hap	Locos								N
	ccmp 2	ccmp 3	ccmp 4	ccmp 6	ccmp 7	ccmp 10	emcrc 74	emcrc 90	
1	140	136	231	119	286	132	122	203	64
2	140	135	231	119	286	132	122	203	20
3	140	135	231	118	286	132	122	203	11
4	140	136	231	118	286	132	122	203	10
5	140	135	231	118	286	131	122	203	5
6	139	137	231	119	286	132	122	203	5
7	140	136	231	119	286	131	122	203	4
8	140	137	231	119	286	131	122	203	4
9	140	153	231	121	286	103	122	205	3
10	140	137	231	118	286	132	122	203	3
11	140	135	231	119	286	131	122	203	3
12	140	153	232	120	286	103	122	205	2
13	139	136	231	119	286	131	122	203	2
14	139	136	231	119	286	132	122	203	2
15	140	136	231	119	286	132	121	203	2
16	139	137	231	118	286	131	122	203	2
17	140	153	231	118	286	103	122	205	1
18	139	137	230	118	286	132	122	203	1
19	140	136	231	121	286	103	122	205	1
20	139	136	232	120	286	103	122	205	1
21	139	153	232	120	286	103	122	205	1
22	140	134	231	119	286	132	122	203	1
23	140	134	231	118	286	132	122	203	1
24	140	135	230	118	286	131	121	203	1
25	140	134	231	118	286	131	122	203	1
26	139	136	231	118	285	132	121	203	1
27	139	136	231	118	286	132	122	203	1
28	140	136	231	118	286	132	121	203	1
29	139	137	231	118	285	132	122	203	1
30	140	137	231	119	286	132	122	203	1
31	139	137	231	118	286	132	122	203	1
32	139	137	231	119	286	132	121	203	1
33	141	136	231	118	286	132	122	203	1
34	140	135	231	119	287	132	122	203	1
35	140	135	231	119	287	131	122	203	1
Total									161

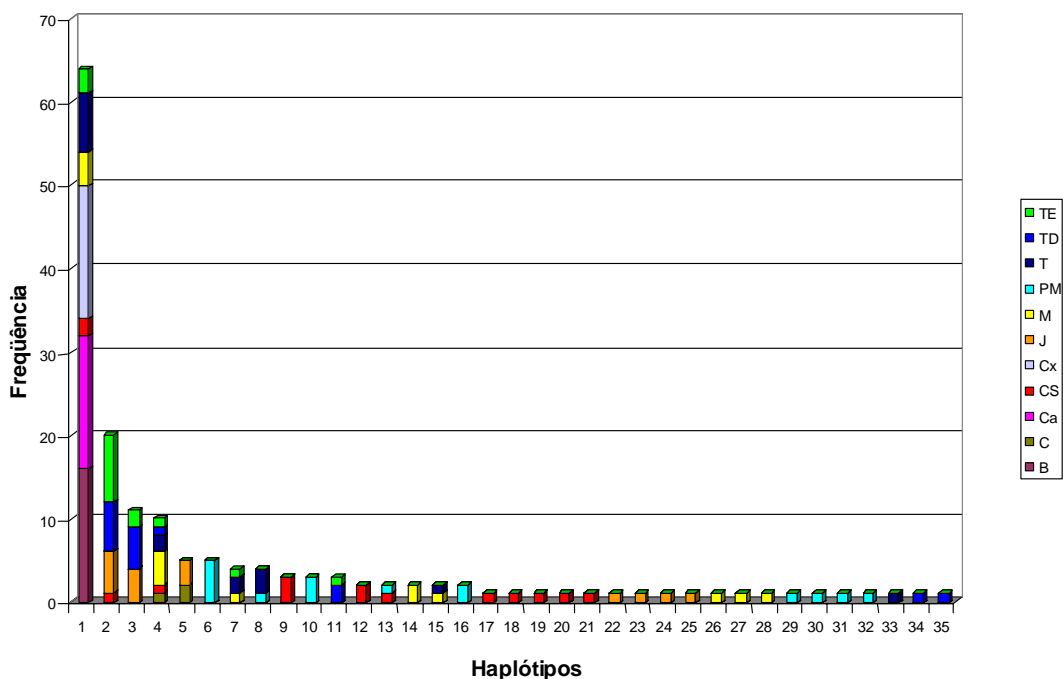


Figura 7 - Frequência dos haplótipos observados na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto de *P. munguba*. B) Beruri-AM; C) Caracará-RR, Ca) Catalão, Manaus-AM; CS) Cruzeiro do Sul-AC; Cx) Floresta Nacional de Caxiuanã-PA; J) Rio Japurá-AM; M) Rio Madeira-AM; PM) Paraná do Mapixi, Rio Purus-AM; TD) Tabatinga-AM (margem direita); TE) Tabatinga - AM (margem esquerda); T) Tefé-AM.

Como três populações mostraram-se monomórficas, optou-se pela análise dos dados microssatélites considerando-se primeiramente todas as populações e outra excluindo as populações monomórficas. Os resultados referentes às medidas de diversidade genética (H_e - Nei, 1987) apresentaram considerável diferença nas duas situações. Os valores de diversidade genética variaram entre 0,0 e 0,433. A diversidade genética média total foi de 0,240 para todas as populações analisadas conjuntamente e de 0,301 quando apenas as populações polimórficas foram consideradas. O índice de fixação (F_{ST}) foi mais alto considerando a análise de todas as populações, quando comparado ao índice obtido excetuando-se as populações monomórficas (Tabela 4).

A tabela 5 mostra a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações, inferidas por meio de uma análise de variância molecular utilizando todas as populações e a tabela 6 mostra somente os dados das populações que apresentaram variabilidade genética. Em ambas as análises, a maior parte da variação genética encontrada pode ser explicada pela variação contida dentro das populações, representando 58,67% da variação encontrada, na análise com todas as populações e 66,45% excluindo as populações monomórficas.

Tabela 4 - Índices de diversidade genética estimados para as populações de *P. munguba* com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto. H_E , diversidade genética (* Diversidade genética total considerando todas as populações, ** Diversidade genética total considerando somente as populações polimórficas); F_{ST1} : índice de fixação considerando todas as populações; F_{ST2} : índice de fixação considerando somente as populações polimórficas.

População	Nº de alelos	Haplótipos	H_E	F_{ST}^1	F_{ST}^2
Beruri	8	1	0	0,45364	--
Caracaraí	9	2	0,16667	0,42080	0,35596
Catalão	8	1	0	0,45364	--
Cruzeiro do Sul	20	11	0,43333	0,33411	0,28409
Caxiuanã	8	1	0	0,45364	--
Japurá	13	7	0,19167	0,40053	0,33916
Madeira	13	8	0,19524	0,39978	0,33854
Paraná do Mapixi	14	9	0,21979	0,39274	0,33270
Tefé	13	6	0,16979	0,40659	0,34418
Tabatinga (margem direita)	12	5	0,14792	0,41265	0,34921
Tabatinga (margem esquerda)	11	7	0,12708	0,41843	0,35399
Total			0,24032*/0,30142**	0,41330	0,33553

Teste de significância (1023 permutações): P = 0,000

Tabela 5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto de *P. munguba* considerando onze populações amostradas.

Fonte de Variação	gl	Soma dos Quadrados	Componentes da Variação	Porcentagem da Variação
Entre Populações	10	65,899	0,41284 Va	41,33
Dentro das Populações	150	87,908	0,58606 Vb	58,67
Total	160	153,807	0,99889	
Índice de Fixação		F_{ST} :	0,41330	

Teste de significância (1023 permutações): P = 0,000

Tabela 6 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto de *P. munguba* considerando somente as populações polimórficas.

Fonte de Variação	gl	Soma dos Quadados	Componentes da Variação	Porcentagem da Variação
Entre Populações	7	47,127	0,42277 Va	33,55
Dentro das Populações	105	87,908	0,83722 Vb	66,45
Total	112	135,035	1,25999	
Índice de Fixação		FST:	0,33553	

Teste de significância (1023 permutações): P = 0,000

Na tabela 7 é apresentada a matriz que correlaciona as distâncias genéticas e as distâncias geográficas, entre as populações de *P. munguba* analisadas par a par. Com base nos resultados do teste de Mantel, que testa a significância da correlação entre as duas variáveis analisadas, rejeitou-se a hipótese de isolamento por distância entre as populações de *P. munguba*. Nesta análise, o coeficiente de correlação r encontrado foi igual a 0,135192 ($p = 0,15$) indicando não haver uma relação direta entre distância genética e a distância geográfica entre as populações de *P. munguba* na Amazônia brasileira (Figura 8).

Tabela 7 - Matriz de correlação entre distâncias genéticas de Reynolds (abaixo da diagonal) e distâncias geográficas euclidianas (acima da diagonal, em Km) entre as populações de *P. munguba*, analisadas par a par.

Populações	B	C	Ca	CS	Cx	J	M	PM	T	TD	TE
B	--	583,1	211,1	1336,5	1128,1	781,3	197,2	347,9	361,3	935,0	942,4
C	2,553	--	541,3	1635,8	1142,2	844,2	675,0	842,1	651,4	1144,2	1164,3
Ca	0,0	2,553	--	1546,0	920,0	964,2	146,7	557,7	559,6	1135,7	1145,7
CS	0,632	0,263	0,632	--	2460,3	841,2	1491,2	1002,1	1030,1	504,2	475,5
Cx	0,0	2,552	0,0	0,632	--	1855,5	970,0	1455,5	1475,2	2058,0	2068,9
J	0,990	0,038	0,990	0,632	0,990	--	980,6	632,9	429,6	338,5	365,6
M	0,325	0,461	0,325	0,370	0,325	0,471	--	486,7	558,4	1117,7	1124,7
PM	1,020	0,576	1,020	0,444	1,020	0,550	0,471	--	271,0	677,7	672,2
T	0,180	0,500	0,179	0,368	0,179	0,442	0,105	0,484	--	578,4	594,8
TD	1,010	0,331	1,010	0,476	1,010	0,039	0,522	0,627	0,455	--	30,0
TE	0,677	0,535	0,677	0,447	0,677	0,165	0,377	0,615	0,257	0,043	--

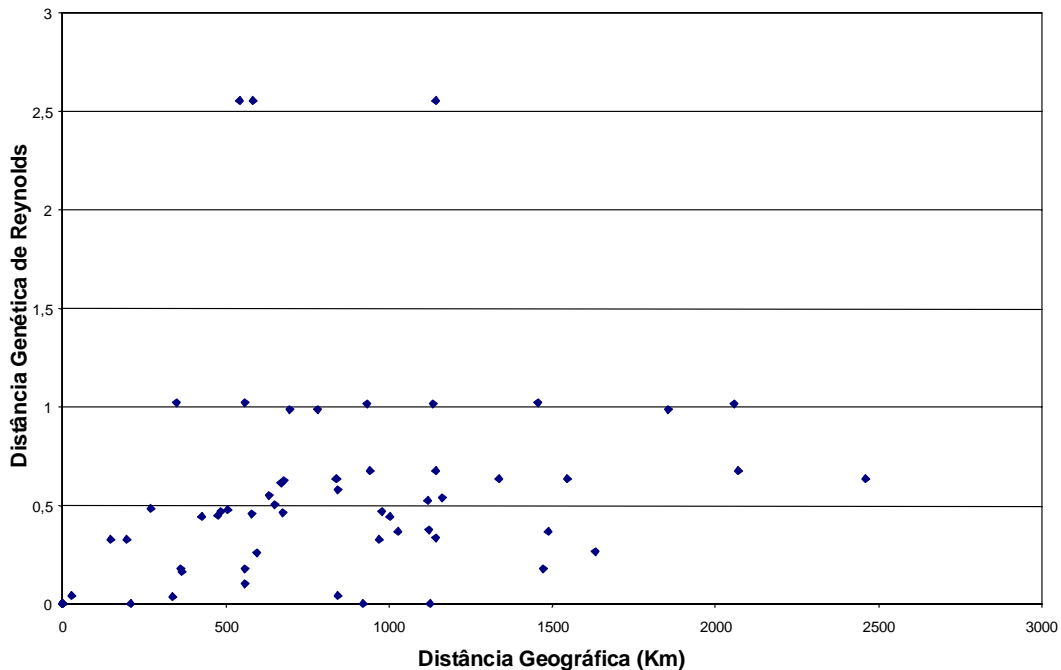


Figura 8 - Relação entre distância genética de Reynolds e distância geográfica (Km) para 11 populações *P. munguba*, analisadas par a par, com base na variação observada em oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto.

Dos 35 haplótipos detectados, a partir da análise da variação encontrada nos oito locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *P. munguba*, dez foram compartilhados entre indivíduos de diferentes populações e 25 haplótipos foram exclusivos a alguma das populações analisadas: um de Tefé - AM, dois de Tabatinga - AM (margem direita), quatro do Madeira - AM, quatro do Japurá - AM, sete de Cruzeiro do Sul - AM e sete do Paraná do Mapixí - AM, como pode ser observado nas figuras 7 e 9. O haplótipo encontrado com maior frequência (39,75%) representa o único haplótipo encontrado na calha central dos rios Solimões e Amazonas, de Beruri-AM a Caxiuanã-PA, abarcando uma extensão de mais de 1.100 Km. Este mesmo haplótipo não foi observado nas populações do Paraná do Mapixi-AM, Japurá-AM e na margem direita em Tabatinga-AM.

As relações entre os haplótipos de microssatélites de cloroplasto de *P. munguba* encontrados, inferidas por meio de uma análise de rede utilizando o método *Median-Joining*, são mostradas na figura 9. Para uma melhor visualização, a figura foi editada de forma que o comprimento das linhas não indica o número de mutações entre os haplótipos

e, portanto, não reflete o grau de relação entre eles. Dois grupos distintos de haplótipos (A e B), separados por um grande número de mutações podem ser observados.

Cruzeiro do Sul - AC (em vermelho) foi a única população que apresentou haplótipos nos dois grupos (A e B), além disso, apresentou o maior número de haplótipos (11), sete deles sendo bastante diferenciados (grupo B) devido a várias mutações e, inclusive, dois *median vectors* que os separam dos demais haplótipos encontrados nas outras regiões da Amazônia (grupo A). Um haplótipo da população de Cruzeiro do Sul - AC apresentou uma relação próxima aos haplótipos de Paraná do Mapixí - AM (em azul claro) e os outros quatro, são compartilhados por outras populações.

O haplótipo mais freqüente (círculo maior) é também o que apresenta relações com um maior número de haplótipos (seis). As relações entre os demais haplótipos não são claras por serem muito próximas, fato evidenciado pelo entrelaçamento das linhas, pelo pequeno número de mutações entre os haplótipos e a existência de somente um *median vector*. Entretanto pode-se observar que as três populações localizadas na região noroeste da Amazônia: Japurá - AM (em laranja), Tabatinga - AM - margem direita (em azul) e Tabatinga - AM - margem esquerda (em verde), assim como as duas populações localizadas na região sudeste: Madeira - AM (em amarelo) e Paraná do Mapixí - AM (em azul), são mais relacionadas entre si que entre as duas regiões.

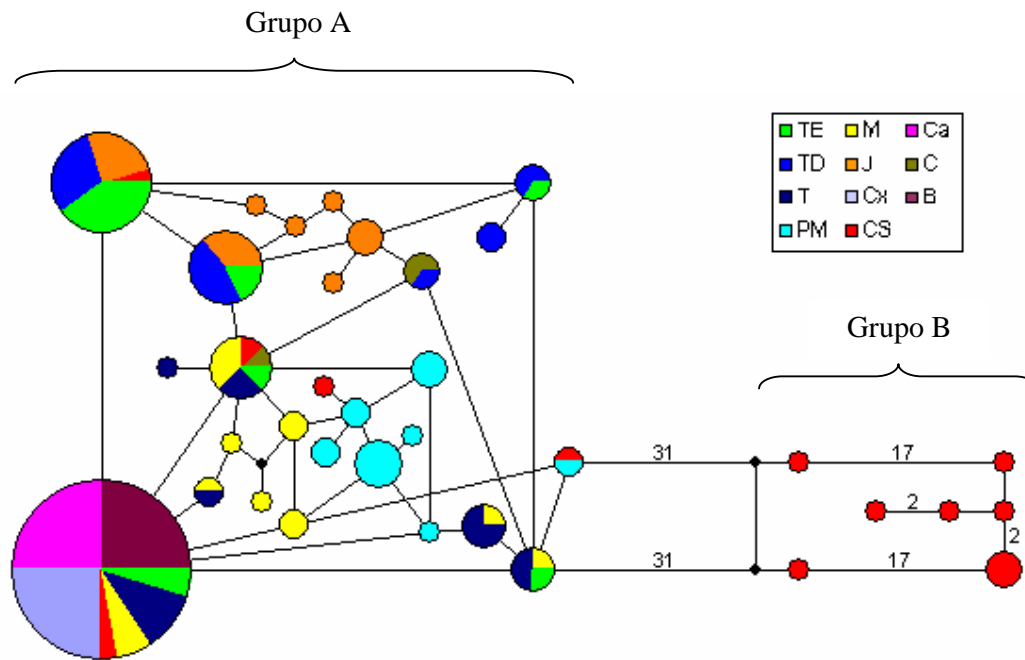


Figura 9 - Relações entre haplótipos a partir de análise de rede (*Network*), com base na variação de oito locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *P. munguba*. Cada círculo se refere a um haplótipo. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de ocorrência do haplótipo. As linhas representam as relações entre os haplótipos e os números, quando presentes, representam o número de mutações entre eles. Linhas que não apresentam números possuem uma única mutação. As cores mostram as populações que apresentam aquele haplótipo. Nodos pretos representam *median vectors* B) Beruri-AM; C) Caracará-RR, Ca) Catalão, Manaus-AM; CS) Cruzeiro do Sul-AC; Cx) Floresta Nacional de Caxiuanã-PA; J) Rio Japurá-AM; M) Rio Madeira-AM; PM) Paraná do Mapixi, Rio Purus-AM; TD) Tabatinga-AM (margem direita); TE) Tabatinga-AM (margem esquerda); T) Tefé-AM.

IV.3. AMPLIFICAÇÃO, SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DAS REGIÕES NÃO CODIFICADORAS DO CPDNA

Foram otimizadas as condições de PCR de quatro dos cinco pares de *primers* testados que amplificam regiões não codificadoras do genoma do cloroplasto de angiospermas. As temperaturas ótimas de anelamento de cada par de *primers*, assim como os tamanhos estimados dos fragmentos amplificados para *P. munguba* são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Características dos marcadores utilizados que amplificam regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto de *P. munguba*. T_A: Temperatura de anelamento.

Região cpDNA	Seqüência dos <i>primers</i> 5' - 3'	T _A (°C)	Tamanho estimado do Fragmento (pb)	Referência
<i>trnH</i>	ACT GCC TTG ATC CAC TTG GC	56	470	Hamilton, 1999
<i>psbA</i>	CGA AGC TCC ATC TAC AAA TGG			
<i>trnS</i>	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	56	700	Hamilton, 1999
<i>trnG</i>	GGA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C			
<i>psbB</i>	GTTTACTTTTGGGCATGCTTCG	64	800	Hamilton, 1999
<i>psbF</i>	CGCAGTTCGTCTTGGACCAG			
<i>atpB</i>	GAAGTAGTAGGATTGATTCTC	64	800	Samuel <i>et al.</i> ,1997
<i>rbcL</i>	CCCTACAACCTCATGAATTAAG			

A figura 10 mostra os produtos da amplificação obtidos para quatro regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto de *P. munguba* após otimização das condições de PCR. Na figura 10 observa-se ainda, diferença considerável nos tamanhos dos fragmentos amplificados para um indivíduo (coluna 6) de *P. munguba* da população de Cruzeiro do Sul-AC, em relação aos demais (colunas 1 a 5 e 7), para as regiões *trnH/psbA* e *trnS/trnG* (Figuras 10A e 10B, respectivamente).

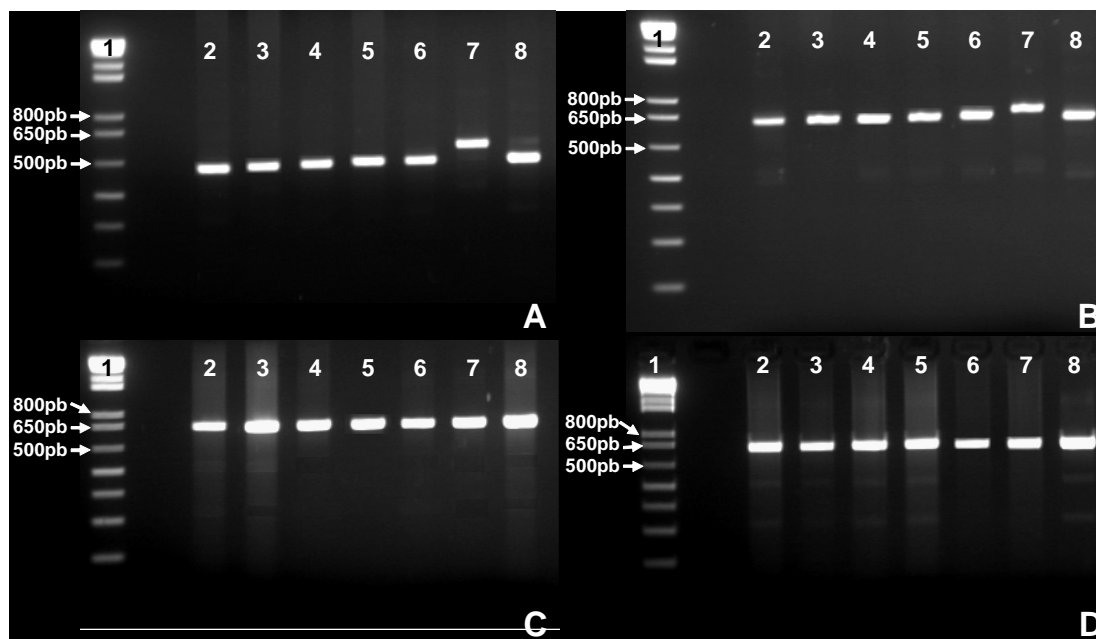


Figura 10 - Amplificação de regiões não codificadoras do cpDNA de *P. munguba*. A coluna M mostra o marcador *1 Kb plus DNA ladder*, as colunas 1 a 7 apresentam fragmentos amplificados do cpDNA de diferentes indivíduos: A) *trnH/psbA*, B) *trnS/trnG*, C) *psbB/psbF*, D) *atpB/rbcL*.

Para a escolha do marcador mais informativo foi feita uma análise preliminar na qual foram seqüenciados 18 indivíduos de *P. munguba* de nove populações (Beruri-AM; Caracaraí-RR, Cruzeiro do Sul-AC; Floresta Nacional de Caxiuanã-PA; Japurá-AM; Madeira-AM; Paraná do Mapixi -AM; Tabatinga-AM - margem direita e Tefé-AM), sendo dois de cada população, utilizando ambos os *primers forward* e *reverse* dos quatro pares de *primers* otimizados.

Apenas os pares de *primers* que amplificam regiões intergênicas *trnS/trnG* (10 substituições) e *psbB/psbF* (1 substituição) apresentaram polimorfismos nas seqüências obtidas, sendo dessa forma escolhida para as análises a região *trnS/trnG*. Na figura 11 são apresentados eletroferogramas obtidos a partir do seqüenciamento de dois indivíduos que apresentaram haplótipos diferentes, mostrando uma substituição nucleotídica.

Foram seqüenciados quatro indivíduos de *P. munguba* das populações Beruri-AM; Cruzeiro do Sul-AC; Floresta Nacional de Caxiuanã-PA; Japurá-AM; Madeira-AM; Paraná do Mapixi -AM; Tabatinga-AM - margem direita e Tefé-AM e três de Caracaraí-RR sendo obtidas um total de 35 seqüências para a região intergênica *trnS/trnG*, em ambos os sentidos (*forward* e *reverse*). As seqüências *trnS/trnG* apresentaram comprimentos entre 650 e 705 pb. Essa diferença no tamanho dos fragmentos deveu-se a diversas inserções/deleções encontradas nas seqüências sendo que a maior variação detectada

correspondeu a de 36 pb como pode ser observado na figura 12. As bases nucleotídicas foram encontradas nas seguintes proporções: T: 38%, C: 17,8%, A: 32% e G: 12,2%. Foram detectadas 10 substituições nucleotídicas.

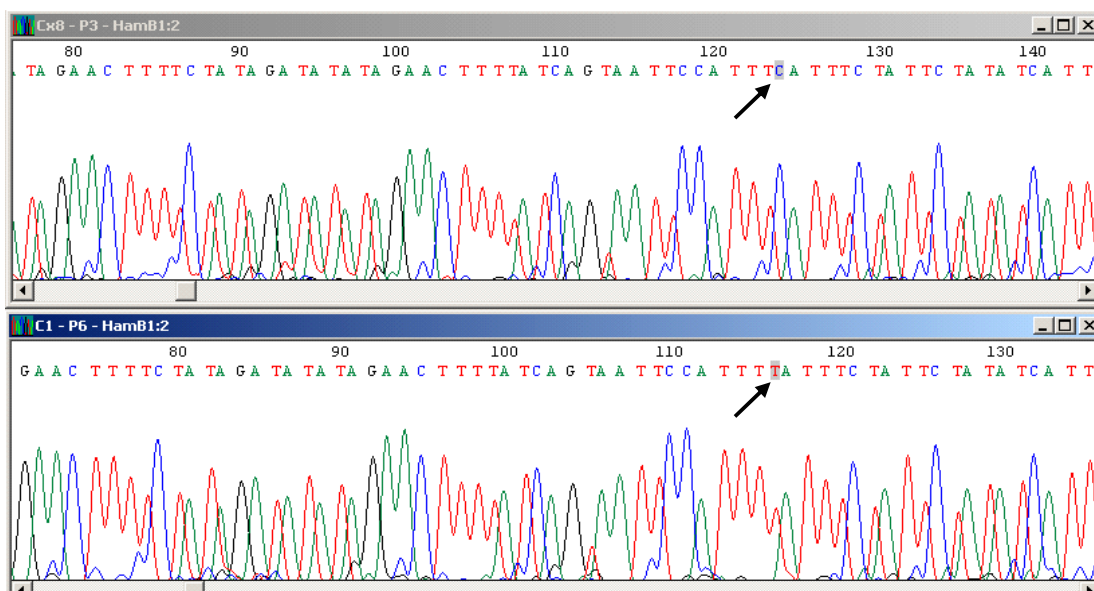


Figura 11 - Eletroferogramas mostrando produtos do seqüenciamento de dois indivíduos de *P. munguba* para a região *tmS/tmG*. As setas indicam uma substituição (C-T) entre duas seqüências.

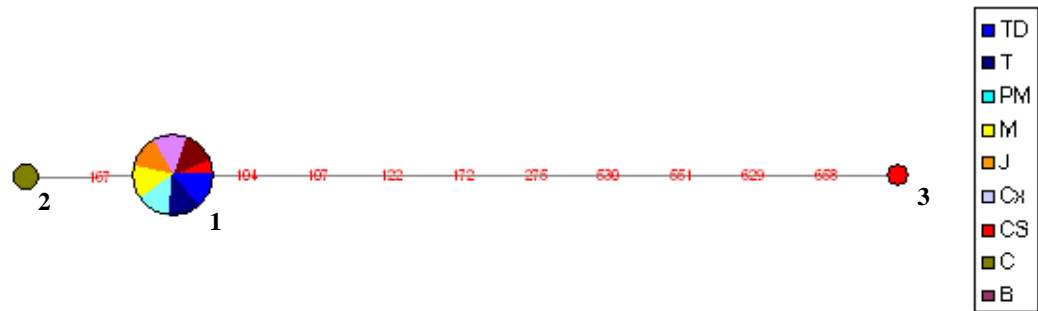


Figura 13 - Relações entre os haplótipos obtidos a partir da análise das seqüências do espaçador intergênico *trnS/trnG* do genoma do cloroplasto de *P. munguba*. Cada círculo refere-se a um haplótipo e o tamanho indica sua freqüência de ocorrência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e nelas são observadas as posições onde ocorreram as substituições. O comprimento das linhas está relacionado ao grau de relação entre os haplótipos. As cores representam as populações: B) Beruri-AM; C) Caracaraí-RR, CS) Cruzeiro do Sul-AC; Cx) Floresta Nacional de Caxiuanã-PA; J) Rio Japurá-AM; M) Rio Madeira-AM; PM) Paraná do Mapixi, Rio Purus-AM; TD) Tabatinga-AM (margem direita); T) Tefé-AM.

V. DISCUSSÃO

A variação nos comprimentos dos fragmentos de locos microssatélites é causada por mutações. Estudos mostram que as taxas de mutação encontradas para esse tipo de marcador são mais altas (10^{-2} a 10^{-6}) que de mutações pontuais (Goldstein & Pollock, 1997, Li *et al.*, 2002). Dois tipos de mecanismos mutacionais foram propostos para explicar essa diferença: “replication slippage” (Tachida & Lizuka, 1992) e “recombination with out-of-phase aligning” (Harding *et al.*, 1992). Ambos os processos resultam em alterações no número de *repeats* e uma consequência desses mecanismos de mutação é que um mesmo estado genético (número de *repeats*) pode evoluir de duas linhagens diferentes, por eventos mutacionais distintos, um fenômeno conhecido por homoplasia. Homoplasias podem causar problemas em análises genéticas populacionais afetando medidas de diversidade genética, fluxo gênico, distâncias genéticas e em análises filogenéticas, sendo consideradas um potencial limitador para o uso de locos microssatélites como marcadores genéticos (Provan *et al.* 2001).

Entretanto, o pequeno número de alelos reportados para locos cpSSR, comparado com locos SSR do genoma nuclear (Powell *et al.*, 1995; Provan *et al.*, 1999), parece sugerir que microssatélites de cloroplasto apresentam uma menor taxa de mutação que aqueles encontrados no núcleo, como demonstrado por Provan *et al.* (1999) em seu estudo com *Pinus torreyana*. Além disso, homoplasias têm sido observadas apenas em categorias taxonômicas acima de gênero (Doyle *et al.*, 1998; Hale *et al.*, 2004), e ainda assim, muitos pesquisadores têm considerado os níveis de homoplasia baixos o suficiente para permitir análises genéticas populacionais (Cuenca *et al.*, 2003; Navascués & Emerson, 2005). Em um estudo comparando simulações computacionais e dados empíricos de uma espécie de *Pinus*, Navascués & Emerson (2005) avaliaram os efeitos da homoplasia nas medidas de diversidade genética baseadas em cpSSR e concluíram que o índice de diversidade genética de Nei (He) é pouco influenciado por homoplasias e que o uso de um grande número de locos contribui para diminuir os efeitos negativos das homoplasias nas estimativas de diversidade genética.

Locos microssatélites no genoma de cloroplasto têm sido utilizados em estudos populacionais, de sistemática e análises filogeográficas nos últimos anos (Powel 1995;

Provan, 1999; Vendramin *et al.*, 1999; Provan *et al.*, 2001; Palmé & Vendramin, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002; Collevatti *et al.*, 2003; Grivet & Petit, 2003; Lira *et al.*, 2003; Butaud, 2005; Cubas *et al.*, 2005; Ueno *et al.*, 2005; Andrianoelina *et al.*, 2006).

No presente estudo os microssatélites de cloroplasto mostraram-se uma ferramenta extremamente útil, possibilitando a observação de variação genética suficiente para a realização de análises populacionais da espécie estudada (*Pseudobombax munguba*). Além disso, o padrão de distribuição geográfica da variação genética encontrada em populações de *P. munguba*, com base na análise de locos microssatélites do genoma do cloroplasto, ao longo de sua distribuição na Amazônia brasileira, em conjunto com os dados obtidos de seqüências do genoma de cloroplasto permitiram o levantamento de hipóteses sobre evolução e dispersão histórica dessas populações.

O número médio de alelos encontrado por loco cpSSR (3,12) foi comparável aos observados em populações naturais de outras espécies de plantas, tais como *Quercus sp.* (2,33; Deguilloux *et al.*, 2003), *Salix reinii* (3,2; Lian *et al.*, 2003) *Silene paradoxa* (2,8; Mengoni *et al.*, 2001), *Pinus pinaster* (4,1; Ribeiro *et al.*, 2002) *Caesalpinia echinata* (3,28; Lira *et al.*, 2003), *Caryocar brasiliense* (3,2; Collevatti *et al.*, 2003), *Magnolia stellata* (3,33; Ueno *et al.*, 2005), *Ulex sp* (4,3; Cubas *et al.*, 2005), *Dalbergia monticola* (3,33; Andrianoelina *et al.*, 2006) e *Helianthus annuus* (6; Wills & Burke, 2006).

Das 11 populações de *P. munguba* estudadas, sete apresentaram polimorfismos para os locos microssatélites analisados, assim como também apresentaram um grande número de haplótipos (5 a 11 haplótipos por população). A população de Caracará-RR apresentou somente dois haplótipos. Entretanto, esta foi a população com menor número de indivíduos amostrados (apenas três), o que provavelmente contribuiu para este resultado. Três populações localizadas ao longo da calha central dos Rios Solimões e Amazonas não apresentaram variações em nenhum dos locos microssatélites analisados, sugerindo a existência de algum evento histórico ocorrido nessa região, o qual provavelmente contribuiu para este resultado. Assim, para não confundir a interpretação dos dados, considerando eventos antigos e atuais, as análises genéticas foram realizadas de duas formas; uma na qual todas as populações amostradas foram incorporadas e outra na qual foram desconsideradas as populações monomórficas.

Como esperado, o índice de diferenciação genética (F_{ST}), considerando-se todas as populações analisadas (0.41), foi maior que o encontrado na análise considerando-se

apenas as populações polimórficas (0,33). Além disso, as análises de variância molecular mostram que a maior parte da variação genética encontra-se dentro das populações, fato comprovado pela presença de 24 haplótipos exclusivos de algumas das populações (um de Tefé - AM, dois de Tabatinga - AM (margem direita), quatro do Madeira - AM, quatro do Japurá - AM, sete de Cruzeiro do Sul - AM e sete do Paraná do Mapixí - AM) e apenas 10 compartilhados por mais de uma população, evidenciando um fluxo gênico materno bastante restrito ou até ausente entre as populações.

Os índices de diversidade genética (H_E) mostraram que as populações localizadas próximo às cabeceiras dos tributários da calha Solimões/Amazonas (Cruzeiro do Sul - AC; Paraná do Mapixi -AM; Madeira - AM; Japurá - AM e Caracará - RR), são em média (H_E médio = 0,24) mais variáveis que as populações localizadas no médio Solimões (Tefé - AM; Tabatinga -AM - margem esquerda; Tabatinga - AM - margem direita), cujo H_E médio foi igual a 0,15. Já as populações do baixo Solimões e Amazonas (Beruri - AM, Catalão - AM e Caxiuana - PA) não apresentaram qualquer polimorfismo nos locos SSR.

As duas populações de Tabatinga - AM apresentaram haplótipos diferentes, inclusive alguns não compartilhados entre as duas margens. Esse fato pode levar à conclusão precipitada que o Rio Solimões é uma barreira ao fluxo gênico em *P. munguba*. No entanto, devido a dispersão anemocórica, e ocasionalmente hidrocórica, das sementes de *P. munguba* o deslocamento das sementes da mungubeira entre diferentes margens de grandes rios é um evento muito provável. Assim, as duas populações de Tabatinga - AM poderiam ser consideradas como uma única população com 32 indivíduos. Tabatinga - AM (margem direita) e Tabatinga - AM (margem esquerda) foram mantidas separadas nas análises para manter uma igualdade no número de indivíduos amostrados entre as populações, pois, exceto Caracará - RR, em todas as outras populações foram genotipados entre 15 e 16 indivíduos/população. Dessa forma, os dados indicam que o aumento no número de indivíduos amostrados pode levar à identificação de um maior número de haplótipos nas populações de *P. munguba*.

A população de Cruzeiro do Sul - AC, apresentou a maior diversidade genética (H_E = 0,43), o maior número de alelos (20) e haplótipos de microssatélites de cloroplasto (11), sendo a única população a apresentar mais de um haplótipo para os dados de seqüências. Além disso, esta população apresentou os haplótipos mais diferenciados para ambos os marcadores. Tais resultados provavelmente refletem um longo período de existência sem gargalos populacionais significativos quando comparado às outras populações estudadas, o

que ocasionou a essa população tempo suficiente para acumular mutações. Assim, a população de Cruzeiro do Sul - AC provavelmente é, das 11 populações de *P. munguba* estudadas, a mais antiga na Amazônia.

Por outro lado, a baixa variação encontrada nas outras regiões da Amazônia brasileira indica que as populações aí localizadas são mais recentes ou sofreram gargalos populacionais em um passado recente que eliminou grande parte da diversidade genética. A presença de um único haplótipo nas três populações da calha central dos rios Solimões e Amazonas poderia ser explicada por ação de seleção natural, mas essa hipótese foi descartada, pois em geral, marcadores microssatélites e seqüências não codificadoras do genoma de cloroplasto apresentam evolução neutra (Schlötter & Wiehe, 1999; Petit & Vendramin, 2007). Uma explicação mais provável é que seja resultante de uma colonização extremamente recente dessa região a partir de um único haplótipo fundador (Ferris *et al.*, 1999; Avise, 2000). A ausência de polimorfismos mesmo em regiões do genoma sujeitas a altas taxas de mutações, como os SSRs do cpDNA, sugere que a irradiação de *P. munguba* ao longo da calha Solimões-Amazonas ocorreu no Pleistoceno recente ou mesmo no Holoceno. A ausência de substituições nucleotídicas em seqüências nas populações mais centrais da Amazônia também indica um curto tempo de divergência nas seqüências do genoma de cloroplasto analisadas para *P. munguba*. Como o cloroplasto é uma molécula única, marcadores de seqüências e locos microssatélites estão ligados e então o tempo de divergência deve ser o mesmo para ambos os marcadores, corroborando assim a hipótese de colonização recente.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem correlacionar as várias hipóteses biogeográficas existentes para a Amazônia: Rios como Barreiras (Wallace, 1849; Capparella, 1988; Ayres & Clutton-Brock, 1992; Haffer, 1992; Patton *et al.*, 1994); a Teoria dos Refúgios (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970; Cerqueira, 1982; Prance, 1982); Centros de Origem e Dispersão (Herskovitz, 1977; Reig, 1984); Gradientes Ecológicos (Endler, 1977, 1982; Patton *et al.*, 1994); Vicariância Geotectônica (Platnick & Nelson, 1978; Cracraft & Prum, 1988; Futuyma, 1992; Amorim & Pires, 1996); Dinâmica dos Rios (Salo *et al.*, 1986) e Lago Amazônico (Klammer, 1984).

Rios não parecem ser barreiras geográficas importantes para a dispersão de *P. munguba*. A dispersão de sementes pelo vento, e eventualmente pela água, descarta a hipótese dos rios como barreiras ao fluxo gênico (Wallace, 1849; Capparella, 1988; Ayres

& Clutton-Brock, 1992; Haffer, 1992; Patton *et al.*, 1994) para essa espécie. *Ceiba pentandra*, espécie da mesma sub-família e com propágulo similar, não apresenta diferenciação entre grandes interflúvios amazônicos, além de ter colonizado a África via dispersão trans-atlântica (Dick *et al.*, 2007).

Variações climáticas, ocorridas no Pleistoceno e em períodos geológicos anteriores que causaram a retração das florestas tropicais em refúgios durante períodos secos e frios, como postula a Teoria dos Refúgios (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970; Cerqueira, 1982; Prance, 1982), provavelmente afetaram em menor grau as planícies de inundação, sazonalmente alagáveis, da Amazônia em comparação com as florestas de terra firme. Por exemplo, durante o Würmian máximo (cerca de 18.000 anos antes do presente), quando ocorreu uma depressão no nível oceânico que pode ter alcançado mais de 100 metros abaixo do nível atual (Irion, 1984), a erosão e o aprofundamento dos vales do rio Amazonas e seus tributários, provavelmente resultou na retração das florestas de várzea que ocorriam nas planícies de inundação desses rios. Entretanto, os habitats de várzea continuaram existindo ao longo da Amazônia durante os períodos glaciais, apesar de ocuparem extensões muito menores do que no presente. Assim, essas alterações provavelmente não afetaram a distribuição de *P. munguba*, pois esta é uma espécie associada à várzea.

O teste de Mantel indicou que não há relação entre distância genética e distância geográfica para as populações de *P. munguba* na Amazônia brasileira. Não havendo isolamento por distância, a hipótese dos Gradientes Ecológicos (Endler, 1977, 1982; Patton *et al.*, 1994), que prevê diferenciação gradual entre as populações em função da sua separação espacial, foi descartada.

A baixa variação genética encontrada em *P. munguba*, mesmo em regiões do genoma sujeito a maiores taxas de evolução como os marcadores moleculares utilizados, sugere a influência de eventos recentes na história de colonização da espécie na Amazônia, o que leva à rejeição da hipótese da Vicariância Geotectônica (Platnick & Nelson, 1978; Cracraft & Prum, 1988; Futuyma, 1992; Amorim & Pires, 1996), por tratar de eventos geológicos muito antigos, ocorridos no período Terciário.

A hipótese da Dinâmica dos Rios (Salo *et al.*, 1986) postula que a erosão lateral e alterações na calha dos rios criam e destroem muitos habitats diferentes nas planícies

alagáveis dos rios, influenciando a criação e manutenção de diversidade ao longo na Amazônia. Em *P. munguba*, foi encontrada uma variação muito baixa, principalmente na calha central Solimões / Amazonas e então, essa hipótese também foi descartada.

Dentre as hipóteses biogeográficas analisadas, a do Lago Amazônico (Klammer, 1984) parece explicar melhor o padrão de distribuição da diversidade genética encontrado para *P. munguba* no presente estudo. Nessa hipótese, ciclos de alterações climáticas durante o Terciário e o Pleistoceno, alternando entre períodos secos-frios e úmidos-quentes, associados respectivamente aos períodos glacial e inter-glacial, afetaram as florestas tropicais não só como resultado de eventos de fragmentação e expansão (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams). Essas oscilações climáticas tiveram papéis globais, levando à elevação e redução do nível dos oceanos em relação ao nível atual. As várzeas dos grandes rios amazônicos formam um ambiente particularmente vulnerável às variações climáticas e, especialmente, a oscilações no nível dos oceanos podem causar perturbações nas planícies de inundação. Com a elevação do nível dos oceanos, as águas marítimas poderiam tanto avançar continente adentro, quanto represar a saída das águas fluviais, causando o extravasamento de muitos rios e gerando amplas áreas alagadas ou mesmo a formação de um grande lago na Amazônia (Klammer, 1984; Morroig & Cerqueira, 1997).

Segundo Klammer (1984), há cerca de 2,5 milhões de anos, no final do Plioceno, o nível dos oceanos pode ter atingido 180 m acima do nível atual (“The Great Foutaratian transgression”) regredindo gradualmente até cerca de 100 m há aproximadamente 750 mil anos, e desde então, várias transgressões e regressões (nove ou dez) de intensidades menores parecem ter ocorrido. Na figura 14 observa-se uma simulação do mapa com o lago amazônico formado, considerando a topografia atual da Amazônia e uma elevação de 120 metros no nível dos oceanos. Observa-se ainda na figura as localizações das populações de *P. munguba* amostradas no presente estudo.

O alagamento levaria à eliminação das florestas de várzea e grande parte da floresta de terra firme na região central da Amazônia. O habitat de várzea provavelmente continuaria existindo nas áreas marginais mais altas dos rios ricos em sedimentos, como os rios Madeira, Purus, Juruá, Solimões, Japurá e Branco (circuladas em amarelo na figura 14). *Pseudobombax munguba*, uma espécie associada às várzeas dos rios de água branca da Amazônia, teria sua distribuição geográfica altamente influenciada pelos eventos de introgressão marinha e alagamento. Os demais tributários do rio Amazonas (rios de águas

claras e negras) são pobres em sedimentos, o que não permite a formação de áreas de várzea em suas planícies e portanto, as cabeceiras desses rios (circuladas em azul claro na figura 14), embora não fossem atingidos pelas águas do Lago Amazônico, não seriam propícios para a manutenção de populações de *P. munguba*.

Populações localizadas em cotas mais altas dos rios de águas brancas (circuladas em amarelo na figura 14) poderiam sobreviver a vários eventos de introgressão marinha e alagamento, permanecendo totalmente isoladas em alguns períodos. As populações situadas em médias altitudes sobreviveriam apenas às introgressões menos severas. Em eventos mais extremos, essas populações seriam eliminadas. Entretanto, com a diminuição gradual do nível das águas, essas áreas seriam paulatinamente recolonizadas, a partir das populações remanescentes das áreas mais altas. Já as populações situadas na calha central Solimões/Amazonas, especialmente no Baixo Solimões, Amazonas e na região estuarina, provavelmente sofreram extinções periódicas devido à submersão total, mesmo nos eventos de introgressões leves. Assim, a recolonização dessas regiões provavelmente foi um evento muito recente, pois só seria possível após a volta dos cursos dos rios a seus níveis atuais.

A população de Cruzeiro do Sul - AC por estar localizada em uma das regiões mais altas (173 m) da Amazônia brasileira, provavelmente sobreviveu a diversos desses eventos, o que explica a grande variabilidade genética observada e a presença de haplótipos exclusivos, considerando-se tanto os dados de seqüências de regiões não-codificadoras e de microssatélites do genoma de cloroplasto.

As populações do Rio Branco são pequenas e isoladas da rede hidrográfica de rios de águas brancas da Amazônia, pois se separam da calha central por cerca de 280 km do Rio Negro, onde não ocorrem áreas de várzea. A população de Caracará - RR (49 m), a única coletada no Rio Branco, apresentou um haplótipo exclusivo nos dados de seqüências de regiões não-codificadoras do genoma de cloroplasto que pode ser explicado por esse isolamento. Entretanto, o tamanho populacional reduzido das populações aí localizadas, pode ter contribuído para uma redução na diversidade genética local, por deriva genética. Assim, um aumento no número de indivíduos amostrados na população de Caracará - RR pode ser importante para corroborar essa hipótese.

As populações que se localizam em altitudes médias: Madeira - AM (32 m), Tefé - AM (46 m), Purus - AM (54 m), Japurá - AM (63 m) e Tabatinga - AM (68 m), teriam sido afetadas em diferentes graus, de acordo com o nível alcançado pelas águas, o que poderia explicar a presença moderada de polimorfismos nos locos microssatélites e a ausência de variação nas seqüências no genoma do cloroplasto de *P. munguba*.

Já as populações localizadas em menores altitudes: Beruri - AM (23 m), Catalão - AM (22 m) e Caxiuanã - PA (10 m), provavelmente foram formadas pela recolonização extremamente recente da região, após a diminuição do nível das águas, resultando na ausência total de variação genética em ambos os marcadores do genoma de cloroplasto utilizados.

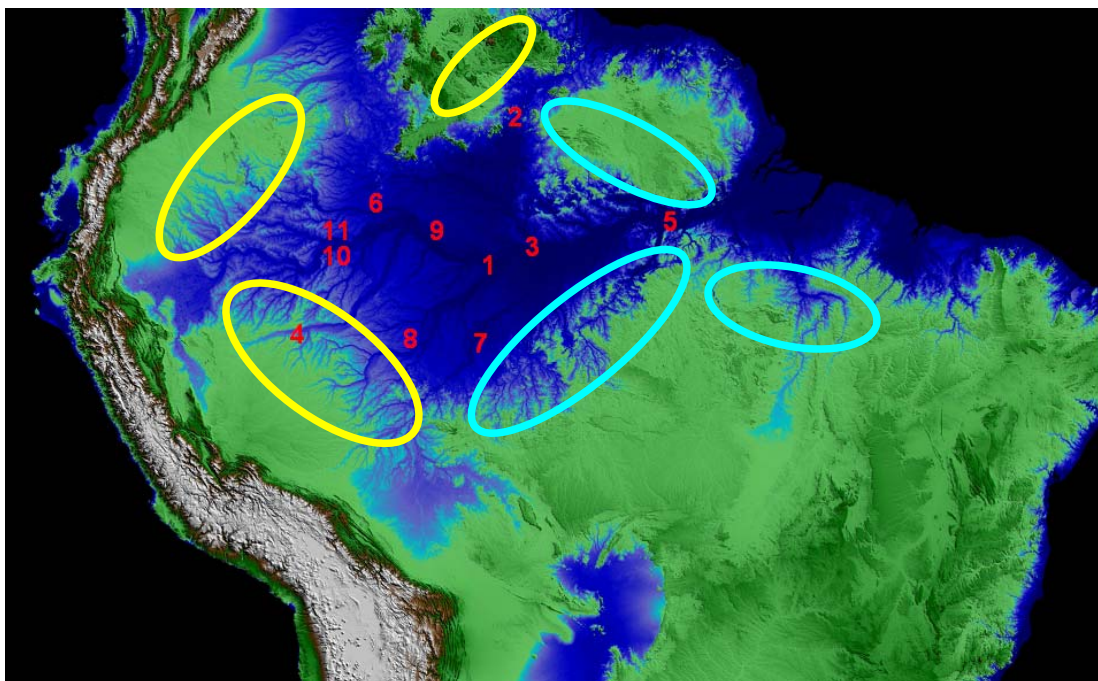


Figura 14 - Mapa mostrando a formação do lago amazônico, com base na simulação do alagamento ocorrido na Amazônia brasileira durante o Pleistoceno, utilizando a topografia atual em função da elevação do nível dos oceanos na cota de 120 m. As regiões mais altas da Amazônia estão circunscritas: em amarelo as cabeceiras dos rios de água branca e em azul claro as cabeceiras dos demais rios. Os números indicam a localização das populações atuais. 1) Beruri-AM; 2) Caracará-RR, 3) Catalão, Manaus-AM; 4) Cruzeiro do Sul-AC; 5) Floresta Nacional de Caxiuanã-PA; 6) Rio Japurá-AM; 7) Rio Madeira-AM; 8) Paraná do Mapixi, Rio Purus-AM; 9) Tefé-AM; 10) Tabatinga -AM (margem esquerda); 11) Tabatinga-AM (margem direita). A área em azul representa as regiões alagadas. O mapa foi gerado utilizando-se como ferramenta o programa Global Mapper Software LLC (<http://www.globalmapper.com>, 2007).

Os dados obtidos com marcadores de DNA (microssatélites e seqüências de regiões não-codificadoras) do genoma do cloroplasto de *P. munguba* indicam então, a possível existência de um evento moderado de introgressão marinha, ocorrido na Amazônia brasileira, provavelmente no final do Plioceno ou durante o Pleistoceno, levando à formação do Lago Amazônico. Populações localizadas em cotas altitudinais mais altas, como a amostrada em Cruzeiro do Sul (173 m), provavelmente mantiveram-se mais estáveis e exibem, no tempo atual, uma maior diversidade haplotípica. As populações da espécie situadas em trechos do curso médio dos rios Japurá, Juruá, Purus, Madeira e Branco, foram mantidas em função da intensidade da elevação ou, no caso de serem eliminadas, tiveram um maior tempo para a recolonização. Essa elevação no nível das águas provavelmente causou a eliminação das populações de *P. munguba* situadas ao longo da calha central dos rios Solimões e Amazonas. Com a volta do curso normal dos rios e a formação das áreas de várzea em sua conformação atual, esses habitats foram recolonizados, possivelmente a partir de um ou poucos indivíduos de uma das populações sobreviventes, resultando na existência de um único haplótipo ao longo da calha central, em função do efeito fundador. A dispersão ao longo dos rios Solimões e Amazonas em direção ao estuário, pelo haplótipo fundador, pode ter se originado em Cruzeiro do Sul - AC, Tabatinga - AM, Tefé - AM ou Rio Madeira - AM, que apresentam este mesmo haplótipo, mas para uma conclusão mais concreta seriam necessárias análises com base em mais marcadores moleculares e populações.

Ainda são poucos os estudos filogeográficos em plantas realizados na Amazônia (Caron *et al.*, 2000; Dick *et al.*, 2003; Dutech *et al.*, 2003, Cloutier *et al.*, 2005; Dick *et al.*, 2007). Dois deles restringem-se a pequenas áreas geográficas (Caron *et al.*, 2000; Dutech *et al.*, 2003), enquanto os outros três (Dick *et al.*, 2003; Cloutier *et al.*, 2005; Dick *et al.*, 2007) destacam-se por serem bem mais abrangentes, cobrindo uma ampla área da região Amazônica, permitindo assim a discussão de algumas hipóteses biogeográficas na Amazônia.

Dick *et al.* (2003), utilizando seqüências do espaçador ribossomal (*ITS*) em um estudo filogeográfico com populações de *Symphonia globulifera* localizadas na América Central, Amazônia e África, atribuíram a expansão da espécie entre continentes à dispersão marinha e a diferenciação regional encontrada, principalmente na América Central, à heterogeneidade geográfica local. Apesar de existirem registros fósseis para a espécie

datando de 15 Ma, os autores não encontraram nenhuma variação entre as populações localizadas na bacia Amazônica e atribuem esse fato a uma expansão recente da espécie na região ou a um extensivo fluxo gênico atual.

Cloutier *et al.* (2005), estudando o efeito da dispersão hidrocórica em *Carapa guianensis* utilizando marcadores PCR-RFLP, encontraram uma forte estrutura populacional regional para a espécie e sugerem uma colonização da bacia Amazônica a partir de múltiplas fontes. Os autores observaram que os haplótipos mais diferenciados foram encontrados nas áreas mais altas (localizadas no Escudo das Guianas e no Escudo Brasileiro) e atribuem este fato aos eventos de introgressão oceânica ocorridos no Terciário e Quaternário.

Dick *et al.* (2007), estudando a filogeografia de *Ceiba pentandra* na América do Sul, América Central e África, encontraram pouca variação em seqüências do espaçador ribossomal (*ITS*) e somente dois haplótipos em seqüências de regiões não codificadoras do genoma de cloroplasto (*psbB-psbF*). Eles descartam a ocorrência de eventos vicariantes na espécie, atribuindo sua ampla expansão geográfica a eventos de dispersão a longas distâncias, da América do Sul para a África, por vento ou correntes marinhas.

A pouca variação genética encontrada nessas três espécies (*S. globulifera*, *C. guianensis* e *C. pentandra*) ao longo da bacia Amazônica e a alta diferenciação encontrada nos haplótipos de *C. guianensis* nas regiões mais altas também poderiam ser explicadas pelos eventos de introgressão oceânicas e a formação do lago Amazônico, como sugerido aqui para *P. munguba*. Com o alagamento das áreas mais baixas, as populações dessas espécies seriam eliminadas, isolando aquelas populações remanescentes nas áreas mais altas, permitindo assim o acúmulo de mutações e a diferenciação de haplótipos (*C. guianensis*; Cloutier *et al.*, 2005). A volta do leito dos rios a seus níveis atuais possibilitaria a recolonização, extremamente recente, da Amazônia a partir das áreas mais altas, levando a uma baixa variação genética por efeito fundador. Além disso, Dick *et al.* (2007) sugerem que a fonte de dispersão de *C. pentandra* da América do Sul para a África seja localizada na Guiana Francesa, uma das áreas mais altas da Amazônia e, portanto, não atingidas pelo alagamento.

Dessa forma, os estudos sobre a filogeografia de espécies de plantas neotropicais de ampla distribuição na Amazônia (Dick *et al.*, 2003; Cloutier *et al.*, 2005; Dick *et al.*, 2007,

presente estudo) parecem concordar e os resultados alcançados corroboram a hipótese do Lago Amazônico como determinante na estruturação genética de suas populações.

VI. CONCLUSÃO

No presente estudo foram apresentados os padrões de distribuição da variabilidade genética e a filogeografia da *P. munguba* na Amazônia brasileira a partir dos quais foi possível concluir que:

- Marcadores microssatélites do genoma de cloroplasto mostraram-se como uma ferramenta extremamente útil, possibilitando a realização de análises populacionais e filogeográficas para *P. munguba*.

- O grande número de haplótipos exclusivos observados com os marcadores microssatélites do genoma de cloroplasto, comparando com o número de haplótipos compartilhados por mais de uma população, sugerem um fluxo gênico materno atual bastante restrito ou até ausente entre as populações de *P. munguba*, considerando a ampla distribuição desta espécie na Amazônia. A utilização de marcadores moleculares de herança bi-parental seria importante para a realização de análises populacionais mais abrangentes.

- A pouca variação encontrada tanto nos marcadores microssatélites quanto nas seqüências do genoma de cloroplasto indicam que a história de colonização de *P. munguba* na Amazônia brasileira é recente, iniciando provavelmente durante o Pleistoceno ou Holoceno.

- A maior variação encontrada na população de Cruzeiro do Sul - AC, localizada em uma das áreas mais elevadas da Amazônia brasileira, em relação ao nível do mar, indica que essa é a mais antiga entre as populações amostradas.

- A total ausência de polimorfismos, mesmo em marcadores altamente variáveis como os microssatélites de cloroplasto, encontrada nas três populações (Beruri - AM, Catalão - AM e Caxiuanã -AM) da calha central Solimões/Amazonas indicam que essas populações foram formadas muito recentemente. Tal formação provavelmente ocorreu pela rápida colonização por efeito fundador a partir de uma única linhagem.

- Os resultados obtidos a partir de marcadores microssatélites e seqüências do genoma de cloroplasto de *P. munguba* corroboram a hipótese biogeográfica do Lago Amazônico como determinante na estruturação genética das populações dessa espécie na

Amazônia brasileira. Além disso, sugerem um recente evento moderado de introgressão marinha, ocorrido durante o Plioceno ou Pleistoceno, que provavelmente levou à formação do Lago Amazônico, mantendo estáveis as populações localizadas nas regiões mais altas. Dependendo do nível das águas, as populações situadas em regiões de altitudes médias podem ter sido mantidas, ou destruídas e recriadas paulatinamente. Já as populações situadas das áreas mais baixas foram totalmente eliminadas e as regiões recolonizadas muito recentemente.

- Um aumento no número de indivíduos de *P. munguba* amostrados por população pode levar à identificação de um maior número de haplótipos, com base na análise de marcadores microssatélites do genoma de cloroplasto, incrementando as análises. Além disso, a análise de um maior número de populações, localizadas especialmente nas cabeceiras dos principais rios tributários do Amazonas e além das fronteiras brasileiras, poderá fornecer dados importantes para um melhor esclarecimento da história de colonização da espécie na Amazônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrianoelina, O.; Rakotondraoelina, H.; Ramamonjisoa, L.; Maley, J.; Danthu, P.; Bouvet, J.-M. 2006. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodiversity and Conservation*, 15: 1109-1128.
- Aldrich, P.R.; Hamrick, J.L.; Chavarriaga, P.; Kochert, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, 7: 933-944.
- Alvarez-Buylla, E.R.; Garay, A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution*, 48: 437-453.
- Alvarez-Buylla, E.R.; Garcia-Barrios R.; Lara-Moreno C.; Martinez-Ramos M. 1996. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 387-421.
- Alverson, W.S.; Karol, K.G.; Baum, D.A.; Chase, M.W.; Swensen, S.M.; Mccourt, R.; Sytsma, K.J. 1998. Circumscription of the Malvales and relationships to other Rosidae: evidence from rbcL sequence data. *American Journal of Botany*, 85(6): 876-887.
- Alverson, W.S.; Whitlock, B.A.; Nyffeler, R.; Bayer, C.; Baum, D.A. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. *American Journal of Botany*, 86: 1474-1486.
- Amorim, D.S.; Pires, M.R.S. 1996. Neotropical biogeography and a methods for maximum biodiversity estimation. In: Bicudo, C.E.M.; N.A. Menezes (Eds.). *Biodiversity in Brazil, a first approach*. CNPq, São Paulo, SP. p.183-219.
- Araujo-Lima, C.A.R.M.; Goulding, M. 1998. *Os frutos do Tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Sociedade Civil Mamirauá/ CNPq/ Rainforest Alliance, Brasília, DF. 186pp.
- Aubréville, A. 1975. Essais de geophyletique dès Bombacacees. *Adansonia*, ser 2, 15: 57-64.
- Avise, J.C. 1998. History and pureview of phylogeography. *Molecular Ecology*, 7: 371-379.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography - the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 447pp.
- Ayres, J.M.; Clutton-Brock, T.H. 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist*, 140: 531-537.
- Balensiefer, D.C.; Vogt, R.C. 2006. Diet of *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) during the dry season in the Mamirauá Sustainable Development Reserve, Amazonas, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*, 5: 312-317.

- Bandelt, H. J.; Forster, P.; Rohlf, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Baum, D. A.; Alverson, W. S.; Nyffeler, R. 1998. A durian by any other name: taxonomy and nomenclature of the core Malvales. *Harvard Papers in Botany*, 3: 315-330.
- Baum, D.A.; Smith, S.D.; Yen, A. 2004. Phylogenetic relationships of Malvaceae (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*, 91: 1863-1871.
- Bawa, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*, 28: 85-92.
- Bawa, K.S. 1993. Effects of deforestation and forest fragmentation on genetic diversity in tropical tree populations. In: Drysdale, R.M.; John, S.E.T.; Yapa, A.C. (Eds). *Genetic conservation and production of tropical forest tree seed*. ASEAN - Canada Forest Tree Seed Centre, Chiang Mai, Thailand. p. 10-16.
- Bawa, K.S.; Perry, D.R.; Beach, J.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany*, 72: 331-345.
- Bayer, C.; Fay, M.F.; de Bruijn, P.Y. 1999. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a circumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid atpB and rbcL DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129: 267-303.
- Bennett, K.J. 1997. *Evolution and ecology: the pace of life*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Boshier, D.H.; Chase, M.R.; Bawa, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. *American Journal of Botany*, 82: 476-483.
- Buckley, D.P.; O'Malley, D.M.; Apsit, V.; Prance, G.T.; Bawa, K.S. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 923-928.
- Bullock, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica*, 17: 287-301.
- Bush, M. B. 1994. Amazonian speciation: a necessarily complex model. *Journal of Biogeography*, 21: 5-17.
- Butaud, J.F.; Rives, F.; Verhaegen, D.; Bouvet, J.M. 2005. Phylogeography of Eastern Polynesian sandalwood (*Santalum insulare*), an endangered tree species from the Pacific: a study based on chloroplast microsatellites. *Journal of Biogeography*, 32: 1763-1774.
- Caicedo, A.L.; Schaal, B.A. 2004. Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Molecular Ecology*, 13: 1871-1882.

- Capparella, A.P. 1988. Genetic variation in Neotropical birds: implications for the speciation process. *Acta XIX Congressus Internationalis Ornithologici*, 19: 1658-1669.
- Caron, H.; Dumas, S.; Marque, G.; Messier, C.; Bandou, E; Petit, R.J.; Kremer, A. 2000. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. *Molecular Ecology*, 9: 1089-1098.
- Cavers, S.; Navarro, C.; Lowe, A.J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology*, 12: 1451-1460.
- Cerqueira, R. 1982. South American landscapes and their mammals. In: Mares, M.A.; Genoways, H.H. (Eds). *Mammalian Biology in South America*. Special Publications Series, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh, Pittsburgh.
- Chase, M.; Kesseli, R.; Bawa, K. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany*, 83: 51-57.
- Claro-Jr, L.; Ferreira, E.; Zuanon, J.; Araujo-Lima, C. 2004. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil. *Acta Amazonica*, 34(1): 133-137.
- Colinvaux, P.A.; de Oliveira, P.E.; Moreno, J.E., Miller, M.C.; Bush, M.B. 1996. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. *Science*, 274: 85-88.
- Collevatti, R.G.; Brondani, R.V.P.; Grattapaglia, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, 83: 748-756.
- Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 349-356.
- Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology*, 12: 105-115.
- Condit, R.; Hubbell, S. P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34: 66-71.
- Cottrell, J.E.; Krystufek, V., Tabbener, H.E.; Milner, A.D.; Connolly, T.; Sing, L., Fluch, S.; Burg, K.; Lefèvre, F.; Achard, P.; Bordács, S.; Gebhardt, K.; Vornam, B.; Smulders, M.J.M.; Vanden Broeck, A.H.; Van Slycken, J.; Storme, V.; Boerjan, W.; Castiglione, S.; Fossati, T.; Alba, N.; Agúndez, D.; Maestro, C.; Notivol, E.; Bovenschen, J.; van Dam, B.C. 2005. Postglacial migration of *Populus nigra* L.: lessons learnt from chloroplast DNA. *Forest Ecology and Management*, 219: 293-312.

- Cracraft, J.; Prum, R. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds. *Evolution*, 42: 603-620.
- Cubas, P.; Pardo, C.; Tahiri, H. 2005. Genetic variation and relationships among *Ulex* (Fabaceae) species in southern Spain and northern Morocco assessed by chloroplast microsatellite (cpSSR) markers. *American Journal of Botany*, 92: 2031-2043.
- Cuenca, A.; Escalante, A.E.; Piñero, D. 2003. Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology*, 12: 2087-2097.
- Deguilloux, M.F.; Dumolin-Lapegue, S.; Gielly, L.; Grivet, D.; Petit, R.J. 2003. A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes*, 3: 24-27.
- Demesure, B.; Comps, B.; Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech *Fagus sylvatica* L. in Europe. *Evolution*, 50(6): 2515-2520.
- Dick, C.W. 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proceedings of the Royal Society, London, B.*, 268:2391-2397.
- Dick, C.W.; Abdul-Salim, K., Bermingham, E. 2003. Molecular systematic analysis reveals cryptic Tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. *The American Naturalist*, 162(6): 691-703.
- Dick, C.W.; Bermingham, E.; Lemes, M.R.; Gribel, R. 2007. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*, no prelo,
- Doyle, J.J.; Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Doyle, J.J.; Morgante, M.; Tingey, S.V.; Powel, W. 1998. Size homoplasy in chloroplast microsatellites of wild perennial relatives of soybean (*Glycine* subgenus *Glycine*). *Molecular Biology and Evolution*, 15: 215-218.
- Dumolin-Lapègue, S.; Pemonge, M.-H.; Petit, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, 6: 393-397.
- Dutech, C.; Maggia, L.; Tardy, C.; Joly, H.I.; Jarne, P. 2003. Tracking a genetic signal of extinction-recolonization events in a neotropical tree species: *Vouacapoua Americana* Aublet in French Guiana. *Evolution*, 57(12): 2753-2764
- Dynesius, M.; Jansson, R. 2000. Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 9115-9120.
- Ehrlich, P.R.; Raven, P.H. 1969. Differentiation of populations. *Science* 165: 1228-1232.
- El Mousadik, A.; Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Molecular Ecology*, 5: 547-555.

- Endler, J. A. 1977. *Geographic variation, speciation, and clines*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Endler, J. A. 1982. Pleistocene forest refuges: fact or fancy? In: Prance, G. T. (Ed). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York. p.641-657.
- Ennos R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72: 250-259.
- Ennos, R.A.; Sinclair, W.T.; Hu, X.-S.; Langdon, A. 1999 Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: Hollingsworth, P.M.; Bateman, R.M.; Gornall, R. J. (Eds). *Molecular Systematics and Plant Evolution*. The Systematics Association Special Volume Series. p.1-19.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131: 479-491.
- Farris C.; King, A.; Hewitt, G.M. 1999. Isolation within species and the history of glacial refugia. In: Hollingsworth, P.M.; Bateman, R.M.; Gornall, R. J. (Eds). *Molecular Systematics and Plant Evolution*. The Systematics Association Special Volume Series. p. 21-34.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, 3ª ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília.
- Ferris, C. 1993. Native oak chloroplasts reveal an ancient divide across Europe. *Molecular Ecology*, 2:337-344.
- Forster, P.; Bandelt, H.J.; Rohl, A. 2000. NETWORK 3.1.1.0. Software available free at: www.fluxus-engineering.com. Fluxus Technology Ltd., Cambridge.
- Futuyma, D.J. 1992. *Biologia Evolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética / CNPq, Ribeirão Preto. 631pp.
- Global Mapper Software LLC. 2007. Disponível em: <<http://www.globalmapper.com>>.
- Godzicker, T.; Williams, J.; Sharp, P.; Sambrook, J. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 39: 439-446.
- Goldstein, D.B.; Pollock, D.D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, 88: 335-342.
- González-Rodríguez, A.; Bain, J.F.; Golden, J.L.; Oyama, K. 2004. Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis-Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology*, 13: 3467-3476.
- Granville, J.-J. 1988. Phytogeographical characteristics of the Guianan forests. *Taxon* 37:578-594.

- Gribel, R. 1988. Visits of *Caluromys lanatus* to flowers of *Pseudobombax tomentosum*: a probable case of marsupial pollination in Central Brazil. *Biotropica*, 20(4): 344-347.
- Gribel, R. 1995. *Reproductive Biology of Two Bombacaceous Trees in the Brazilian Central Amazon*. Doctor of Philosophy's Thesis. University of St. Andrews, St. Andrews, United Kingdom, 185p.
- Gribel, R. 2003. Polinização por morcegos em Bombacaceae: Conseqüências para o sistema reprodutivo e estrutura genética das populações. In: Jardim, M.A.G.; Bastos, M.N.C.; Santos, J.U.M. (Eds.). *54º Congresso Nacional de Botânica, 2003, Belém. Desafios da Botânica no Novo Milênio: Inventário, Sistematização e Conservação da Diversidade Vegetal*. MPEG, UFRA, EMBRAPA, Belém, PA. p.108-110.
- Gribel, R.; Abbott, R.J. 1996. Genetics of cytosolic phosphoglucose isomerase (PGI) variation in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). *Heredity*, 76: 531-538.
- Gribel, R.; Gibbs, P.E. 2002. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 163(6): 1035-1043.
- Grivet, D.; Petit, R.J. 2002. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology*, 11: 1351-1362.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131-1969.
- Haffer, J. 1992. On the river effect in some forest birds of southern Amazonia. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia*, 8: 217-245.
- Hale, M.L.; Borland, A.M.; Gustafsson, M.H.; Wolff, K. 2004. Causes of size homoplasy among chloroplast microsatellites in closely related *Clusia* species. *Journal of Molecular Evolution*, 58: 182-190.
- Hall, P.; Chase, M.R.; Bawa, K.S. 1994. Low genetic variation but high population differentiation in a common tropical forest tree species. *Conservation Biology*, 8, 471-482.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hamilton, M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, 8:521-523.
- Hamilton, M.B.; Braverman, J.M.; Soria-Hernanz, D.F. 2003. Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 1710-1721.
- Hamrick, J.L. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: Urbanka, K.M. (Ed). *Differentiation Patterns in Higher Plants*. Academic Press, London. p. 53-67.

- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W. 1990. Allozyme diversity in plant species. *In*: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L.; Weir, B.S. (Eds). *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA. p. 43-63.
- Hamrick, J.L.; Loveless, M.D. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. *In*: Bock, J.H.; Linhart, Y.B (Eds.). *The Evolutionary Biology of Plants*, Westview Press, Boulder, CO. p.129-146.
- Harding, R.M.; Boyce, A.J.; Clegg, J.B. 1992. The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*, 132: 847-859.
- Harris, S.A.; Ingram, R. 1991. Chloroplast DNA and biosystematics: The effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon*, 40: 393-412.
- Hershkovitz, P. 1977. *Living New World monkeys*. Vol. 1. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247-276.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 908-913.
- Hewitt, G.M. 2004. The structure of biodiversity - Insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, 1:4.
- Hong, Y.P.; Hipkins, V.D.; Strauss, S.H. 1993. Chloroplast DNA diversity among trees, populations and species in the California closed-cone pines (*Pinus radiata*, *Pinus muricata* and *Pinus attenuata*). *Genetics*, 135: 1187-1196.
- Irion, G. 1984. Sedimentation and sediments of Amazonian rivers and evolution of the Amazonian landscape since Pliocene times. *In*: Sioli, H. (Ed). *The Amazon: Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W. Junk. Publishers Dordrecht.
- King, R.A.; Ferris, C. 1998. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology*, 7: 1151-1161.
- Klammer, G. 1984. The relief of the extra-Andean Amazon basin. *In*: Sioli, H. (Ed). *The Amazon: Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Lavin, M.; Matthews, S.; Hughes, C. 1991. Chloroplast DNA variation in *Glicidia sepium* (Leguminosae): Intraspecific phylogeny and tokogeny. *American Journal of Botany*, 78: 1576-1585.
- Lemes, M.R. 2000. *Population genetic structure and mating system of Swietenia macrophylla King (Meliaceae) in the Brazilian Amazon: Implications for Conservation*. PhD Thesis, University of Stirling, UK. 167pp.
- Lemes, M.R.; Brondani, R.P.V.; Grattapaglia, D. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis in mahogany, *Swietenia macrophylla* King

- (Meliaceae), a threatened Neotropical timber species. *Journal of Heredity*, 93: 287-291.
- Lemes, M.R.; Gribel, R.; Proctor, J.; Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12: 2875-2883.
- Li, Y-C; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- Lian, C.L.; Oishi, R.; Miyashita, N. 2003. Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12: 609-618.
- Lira, C.F.; Cardoso, S.R.S.; Ferreira, P.C.G.; Cardoso, M.A.; Provan, J. 2003. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*, 12: 3219-3225.
- Litt, M.; Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle of actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397-401.
- Lorenz-Lemke, A.P.; Muschner, V.C.; Bonatto, S.L.; Cervi, A.C.; Salzano, F.M.; Freitas, L.B. 2005. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany*, 95: 799-806.
- Matos, J.A.; Schaal, B.A. 2000. Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A coalescent approach to hybridization. *Evolution* 54(4): 1218-1233.
- Mayer, M.S.; Soltis, P.S. 1994. The evolution of serpentine endemics: a chloroplast DNA phylogeny of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). *Systematic Botany*, 19: 557-574.
- McCauley, D.E. 1994. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 8127-8131.
- Mengony, A.; Barabesi, C.; Gonnelli, C.; Galardi, F.; Gabbrielli, R.; Bazzicalupo, M. 2001. Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 10: 1909-1916.
- Miller, A.; Schaal, B. 2005. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36): 12801-12806.
- Monteiro, M.P.; Sawyer, D. 2001. Diagnóstico demográfico, socioeconômico e de pressão antrópica na região da Amazônia Legal. In: Capobianco, J.P.R.; Veríssimo, A.;

- Moreira, A.; Sawyer, D.; Santos, I.; Pinto (Eds). *Biodiversidade na Amazônia Brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios*. São Paulo: Estação Liberdade/ Instituto. p.308-320.
- Morgante, M.; Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182.
- Morroig, G.; Cerqueira, R. 1997. Plio-Pleistocene South American history and The Amazon Lagoon Hypothesis: A piece in the puzzle of Amazonian diversification. *Journal of Comparative Biology* 2: 103-119.
- Murawski, D.A.; Hamrick, J.L.; Foster, R.B. 1990. Mating systems of two Bombacaceous trees of neotropical moist forest. *Oecologia*, 82: 501-506.
- Murawski, D.A.; Hamrick, J.L. 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity*, 67: 167-174.
- Murawski, D.A.; Hamrick, J.L. 1992. The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering-tree density: a test of predictions. *Biotropica*, 24: 99-101.
- Navascués, M.; Emerson, B.C. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Molecular Ecology*, 14: 1333-1341.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Novick, R.R.; Dick, C.W.; Lemes, M.R.; Navarro, C.; Caccone, A; Bermingham, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12: 2885-2893.
- Olsen, K.M. 2002. Population history of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Ecology*, 11: 901-911.
- Olsen, K.M.; Schaal, B.A. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 5586-5591.
- O'Malley, D.M.; Bawa, K.S. 1987. Mating system of a tropical rain forest tree species. *American Journal of Botany*, 74: 1143-1149.
- O'Malley, D.M.; Buckley, D.P.; Prance, G.T.; Bawa, K.S. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb & Bonpl.: Lecythidaceae). 2. Mating system. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 929-932.
- Oxelman, B.; Lidén, M.; Berglund, D. 1997. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 206:393-410.
- Palmé, A.E.; Vendramin, G.G. 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology*, 11: 1769-1780.

- Palmer, J.D. 1992. Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. *In: Soltis, P.S.; Soltis, D.E.; Doyle, J.J. (Eds). Molecular Systematics of Plants*, Chapman and Hall, New York, p.36-49.
- Patton, J.L.; da Silva, M.N.F.; Malcolm, J.R. 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution*. 48: 1314-1323.
- Pennington, R.T.; Prado, D.A.; Pendry, C. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Pleistocene vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27:261-273.
- Petit, R.J.; Csaikl, U.M.; Bordács, S.; Burg, K.; Coart, E.; Cottrell, J.; van Dam, B.; Deans, J.D.; Dumolin-Lapegue, S.; Fineschi, S.; Finkeldey, R.; Gillies, A.; Glaz, I.; Goicoechea, P.G.; Jensen, J.S.; König, A.O.; Lowe, A.J.; Madsen, S.F.; Matyas, G.; Munro, R.C.; Oledska, M.; Pemonge, M.-H.; Popescu, F.; Slade, D.; Tabbener, H.; Turchini, D.; de Vries, S.G.M.; Ziegenhagen, B.; Kremer, A. 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, 156: 5-26.
- Petit, R.J.; Vendramin, G.G. 2007. Plant phylogeography based on organelle genes: an introduction. *In: Weiss, S.; Ferrand, N. (Eds). Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer. p. 23-97.
- Pires, J.M. 1974. Tipos de vegetação da Amazônia. *Brasil Florestal*, 5: 48-58.
- Pires, J.M.; Prance, G.T. 1985. The vegetation types of the Brazilian Amazon. *In: Prance, G.T.; Lovejoy, T.E. (Eds). Key environments Amazonia*. Pergamon Press. Oxford. p.109-145.
- Platnick, N.I.; Nelson, G. 1978. A method of analysis for historical biogeography. *Systematic Zoology*, 27: 1-16.
- Powell, W.; Morgante, M.; McDevitt, R.; Vendramin, G.G.; Rafalski, J.A. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes - applications to the population-genetics of pines. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 92: 7759-7763.
- Prance, G. T. 1982. Forest refuges: evidence from woody angiosperms. *In: Prance, G. T. (Ed). Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York. p. 137-158.
- Provan, J.; Soranzo, N.; Wilson, N. J.; McNicol, J.W.; Morgante, M.; Powell, W. 1999. The use of uniparentally inherited simple sequence repeat markers in plant population studies and systematics. *In: Hollingsworth, P.M.; Bateman, R.M.; Gornall, R.J. (Eds). Molecular Systematics and Plant Evolution*. The Systematics Association Special Volume Series. p. 35-50.
- Provan, J.; Powell, W.; Hollingsworth, P.M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 142-147.

- Rafalski, J.A., Vogel, J.M., Morgante, M., Powell, W.; Andre, C.; Tingey, S.V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. *In: Birren, B.; Lai, E. (Eds). Analysis of Nonmammalian Genomes - a practical guide.* Academic Press, New York. p.75-134.
- Reig, O. 1984. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muróideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Revista Brasileira de Genética*, 7: 333-365.
- Reynolds, J.; Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1983 Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105:767-779.
- Ribeiro, M.M.; LeProvost, G.; Gerber, S.; Vendramm, G.G.; Anzidei, M.; Decroocq, S.; Marpeau, A.; Mariette, S.; Plomion, C. 2002. Origin identification of maritime pine stands in France using chloroplast simple-sequence repeats. *Annals of Forest Science*, 59: 53-62.
- Ritland, K. 1983. Estimation of mating systems. *In: Tanksley, D.; Orton, T.J. (Eds). Isozymes in plant breeding and genetics - part A.* Elsevier, Amsterdam. p. 289-302.
- Robyns, A. 1963. Essai de monographie du genre *Bombax* s. L. (Bombacaceae). *Bulletin du Jardin Botanique de L'Etat Bruxelles*, 33: 1-315.
- Rull, V. 1998. Biogeographical and evolutionary considerations of *Mauritia* (Arecaceae), based on palynological evidence. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 100:109-122.
- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, M. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Salo, J.; Kalliola, R.; Häkkinen, I.; Mäkinen, Y.; Niemelä, P.; Puhakka, M.; Coley, P.D. 1986. River dynamics and the diversity of Amazon lowland forest. *Nature*, 322: 254-258.
- Samuel, R., Pinsker, W., Kiehn, M. 1997. Phylogeny of some species of *Cyrtandra* (Cesneriaceae) inferred from the atb/rbcL cpDNA intergene region. *Botanica Acta*, 110: 503-510.
- Schaal, B.A.; Hayworth, D.A.; Olsen, K.M.; Rauscher, J.T.; Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7:465-474.
- Schneider, S.; Kueffer, J.M.; Rosseli, D.; Excoffier, L. 2001. Arlequin version 2.001: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sick, H. 1967. Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para a avifauna. *Atas do Simpósio sobre a biota amazônica*, 5(Zoologia): 495-520.
- Schlötter, C.; Wiehe, T. 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. *In: Goldstein, D.B.; Schlötter, C. (Eds). Microsatellites - Evolution and Application.* Oxford University Press, New York. p. 238-248.

- Soltis, D.E. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution*, 206: 353-373.
- Steane, D.A.; Jones, R.C.; Vaillancourt, R.E. 2005. A set of chloroplast microsatellite primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Molecular Ecology Notes*, 5: 538-541.
- Tachida, H.; Iizuka, M. 1992. Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics*, 131: 471-478.
- Tautz, D.; Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138.
- Terauchi, R.; Terachi, T.; Tsunewaki, K. 1991. Intraspecific variation of chloroplast DNA in *Dioscorea bulbifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 461-470.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- Ueno, S.; Setsuko, S.; Kawahara, T.; Yoshimaru, H. 2005. Genetic diversity and differentiation of the endangered Japanese endemic tree *Magnolia stellata* using nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 6: 563-574.
- Vanzolini, P.E.; Williams, E.E. 1970. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arq. Zool.*, 19: 1-298.
- Vendramin, B.; Degen, B.; Petit, R.J.; Anzidei, M.; Madaghiele, A.; Ziegenhagen, B. 1999. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Molecular Ecology*, 8: 1117-1126.
- Wallace, A.R. 1849. On the monkeys of the Amazon. *Zoological Society of London*, 20:107-110.
- Ward, M.; Dick, C.W.; Gribel, R.; Lowe, A.J. 2005. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, 95: 246-254.
- Webb, R. S.; Rind, D. H.; Lehman, S. J.; Healy, R. J.; Sigman, D. 1997. The influence of ocean heat transport on the climate of the last Glacial Maximum. *Nature*, 385: 695-699.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 8:1358-1370.
- Weisinger, K.; Gardner, R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42: 9-19.
- Wills, D.M.; Burke, J.M. 2006. Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Heredity*, 97:403-408.

- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.
- White, G.M.; Boshier, D.H.; Powell, W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 2038-2042.
- Whitemore, T.C.; Prance, G.T. 1987. *Biogeography and Quaternary history in tropical America*. Oxford Monographs in Biogeography, n° 3, Oxford University Press, New York.
- Williams, D.; Dunkerley, D.; DeDeckker, P.; Kershaw, P. 1998. Chappell, M. *Quaternary Environments*. Arnold, London, p.1-329.
- Williams, T.C.; Williams, J.M. 1970. Radio tracking of homing and feeding flights of a neotropical bat, *Phyllostomus hastatus*. *Animal Behaviour*, 18: 302-309.
- Willis, K. J.; Whittaker, R.J. 2000. The refugial debate. *Science* 287:1406-1407.
- Worbes, M. 1992. On the dynamics, floristic subdivision and geographical distribution of varzea forests in central Amazonia. *Journal of Vegetation Science*, 3: 553-564.