

ELIVANIA CONCEIÇÃO BARRAL

**BIOLOGIA REPRODUTIVA, ECOLOGIA DE POPULAÇÕES E FILOGEOGRAFIA
DE *AMBURANA CEARENSIS*, LEGUMINOSAE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

Recife

2018

ELIVANIA CONCEIÇÃO BARRAL

**BIOLOGIA REPRODUTIVA, ECOLOGIA DE POPULAÇÕES E FILOGEOGRAFIA
DE *AMBURANA CEARENSIS*, LEGUMINOSAE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Vegetal da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Biologia
Vegetal.

Área de concentração: Ecologia

Orientadora: Ariadna Valentina Lopes

Coorientador: Oswaldo Cruz Neto

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Barral, Elivânia Conceição

Biologia reprodutiva, ecologia de populações e filogeografia de *Amburana cearensis*, leguminosae ameaçada de extinção / Elivânia Conceição Barral- 2018.

128 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ariadna Valentina Lopes

Coorientador: Oswaldo Cruz Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. *Amburana cearensis* 2. Filogeografia 3. Diversidade genética I. Lopes, Ariadna Valentina (orient.) II. Cruz Neto, Oswaldo (coorient.) III. Título

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-051

ELIVANIA CONCEIÇÃO BARRAL

**BIOLOGIA REPRODUTIVA, ECOLOGIA DE POPULAÇÕES E FILOGEOGRAFIA
DE *AMBURANA CEARENSIS*, LEGUMINOSAE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de Concentração Ecologia Vegetal, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Biologia Vegetal.

Aprovada em 19/02/2018

BANCA EXAMINADORA:

Dra. ARIADNA VALENTINA LOPES (Orientadora)-UFPE

Dra. REBECA RIVAS COSTA ALBUQUERQUE (Titular externo) – UFPE

Dra. LAIS ANGÉLICA PINHEIRO BORGES (Titular exteno) – UFPB

Dra. ISABEL CRISTINA MACHADO (Titular interno) - UFPE

Dr. ANTÔNIO FERNANDO MORAES DE OLIVEIRA (Titular interno) – UFPE

À Evandro Lopes da Silva (*in memoriam*)
de quem recebi imenso amor, incentivo e
apoio constante durante toda minha jornada
acadêmica tornando real mais um sonho,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que durante mais uma etapa da minha vida me ajudaram, me ensinaram e me acompanharam, em especial:

À minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Ariadna Valentina Lopes, por sua amizade, paciência, dedicação e carinho dispensados na realização deste estudo e pelo estímulo constante e confiança de me orientar desde a iniciação científica. Pelo forte apoio fora e dentro do universo acadêmico diante das dificuldades pessoais e profissionais ao longo desta jornada.

Ao meu coorientador, Dr. Oswaldo Cruz Neto, por sua amizade, carinho e atenção dispensados no desenvolvimento deste estudo, como pelo apoio profissional e pessoal.

À Prof^a Dr^a Andrea Pedrosa Harand, por sua grande contribuição e pela dedicação em me apresentar e inserir na Biologia Molecular.

Ao Dr. Toby Pennington pela colaboração no estudo filogeográfico através da doação de material botânico de difícil acesso.

À minha família e em especial aos meus pais Eliane e Edvan (*in memorian*), meus avós Gilvete e José (*in memorian*) e minhas irmãs Edvania e Michele por todo incentivo e amor durante todas as etapas da minha vida.

Aos Integrantes do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva – Polinizar, especialmente às minhas amigas, Ana Carolina a quem tenho enorme carinho e sou muito grata pela amizade e pelo apoio na vida acadêmica e Isabelle Albuquerque pelo companheirismo em laboratório e em campo e incentivo às minhas pesquisas.

Aos integrantes da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim (EAIP) – UFRPE em especial a Eurico Lustosa, Márcio e Flávio pelo carinho, apoio e atenção dispensados para que eu desenvolvesse o trabalho de campo necessário à realização desta pesquisa.

À Tatiane Pereira de Souza e ao Prof. Dr. Marcelo Trindade Nascimento da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) que me deram total suporte em minha estadia no Rio de Janeiro, para coletas de material importante ao estudo filogeográfico.

À FACEPE, pela bolsa de Doutorado concedida durante todo o curso.

RESUMO

Amburana cearensis (Allemão) A. C. Sm. é uma leguminosa encontrada em Florestas Sazonalmente Secas e de estimado valor socioeconômico na caatinga, que se encontra em perigo de extinção devido ao corte seletivo e ilegal pela comunidade local. Diante do *status* de conservação desta espécie o objetivo desta tese foi gerar conhecimentos ecológicos e genéticos, para melhor visualização do panorama sobre as estratégias reprodutivas, a dinâmica populacional e a distribuição da diversidade genética de *A. cearensis*, com vistas a sua conservação. Foi investigado os sistemas de polinização e de cruzamento de *A. cearensis* através de observações e coletas de campo quanto aos seus visitantes florais e por meio de polinizações manuais. A fim de verificar a dinâmica populacional, a estrutura diamétrica e a distribuição espacial foi descrita analisando duas populações em vegetação de Caatinga no município de Parnamirim, PE. Para a descrição da diversidade genética ao longo da distribuição geográfica de *A. cearensis* foi desenvolvido um estudo filogeográfico com marcadores microssatélites nucleares espécie-específico e plastidiais universais utilizando material botânico coletado no Brasil, Argentina e Peru. *Amburana cearensis* apresentou características florais falenófila com antese crepuscular estendida a um período diurno possibilitando assim um sistema de polinização misto, com a participação das abelhas como vetores efetivos de pólen. A produção de frutos é naturalmente baixa, comum de espécies arbóreas, controlado por um provável sistema autoincompatível de ação tardia. As populações, apresentaram uma estrutura populacional diamétrica com tendência a distribuição exponencial negativa (“J-invertido”) típica de populações autorregenerativas. Contudo, diferenças na densidade populacional, no porte dos indivíduos e na distribuição espacial parecem responder diferentes fatores como solo, retrição hídrica e perturbação antrópica. Nas análises filogeográficas, foi possível observar um nível moderado de estruturação genética analisando 14 populações. Além disso, descritores da diversidade genética apontam que mesmo a população sendo ameaçada, ainda há variabilidade possivelmente suficiente para manutenção de suas populações. Sob uma visão geral, o presente estudo através das diversas áreas de conhecimento aqui abordadas provê informações que podem auxiliar planos de manejo e direcionar estratégias de conservação desta leguminosa típica de caatinga, além de contribuir para futuras avaliações do seu *status* quanto ao perigo de extinção.

Palavras-chave: *Amburana cearensis*. Diversidade genética. Estrutura populacional. Sistema de polinização misto. Sistema de cruzamento.

ABSTRACT

Amburana cearensis (Allemão) A. C. Sm. is a legume found in Seasonally Dry Forests, of estimated socioeconomic value in the caatinga, and is in danger of extinction due to selective and illegal cutting by the local community. In view of the conservation status of this species, the aim of this thesis was to generate ecological and genetic knowledge to understand the reproductive strategies, the population dynamics and the distribution of the genetic diversity of *A. cearensis*, considering its conservation. For the analysis of the reproductive characteristics, we investigated the pollination and cross - breeding systems of *A. cearensis* through observations of floral visitors and reproductive experiments. In order to verify the population dynamics, the diametric structure and spatial distribution we analyzed two populations in Caatinga vegetation in Parnamirim, PE. For the description of the genetic diversity along the geographical distribution of *A. cearensis* we are developing a phylogeographic study with species-specific and universal plastidial nuclear microsatellite markers using botanical material collected in Brazil, Argentina and Peru. *Amburana cearensis* presented floral characteristics that classify it as a phalenophilous species with twilight anthesis extended to a daytime period, allowing a mixed pollination system, with the participation of bees as effective vectors of pollen during the diurnal phase of its anthesis. The fruit production is naturally low, common of arboreal species, controlled by a probable autoincompatible system of late action. Populations, independent of the degree of disturbance, presented a diametric population structure with a tendency for negative exponential distribution ("J-inverted") typical of self-regenerative populations, in which smaller individuals are observed to successively replace adult individuals in the population. However, differences in population density, size of individuals and spatial distribution are responding to soil, hydric restriction and anthropogenic disturbance. In analyzes of the phylogeographic study, was possible to observe a moderate level of genetic structuring in 14 populations. In addition, descriptors of genetic diversity point out that even the population being threatened, there is still variability sufficient to maintain the populations. In an overview, the present study, through the different areas of knowledge, provides information that can help management plans and guide strategies for the conservation of this typical caatinga legume, as well as contribute to future assessments of its status regarding the danger of extinction.

Keywords: *Amburana cearensis*. Anthropogenic disturbance. Genetical diversity. Pollinating and crossing system.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1	TÁXON ESTUDADO: GÊNERO E ESPÉCIE.....	12
2.2	<i>AMBURANA CEARENSIS</i> (ALLEMÃO) A.C.SM: BIOLOGIA REPRODUTIVA....	12
2.3	<i>AMBURANA CEARENSIS</i> (ALLEMÃO) A.C.SM: ODOR FLORAL.....	13
2.4	<i>AMBURANA CEARENSIS</i> (ALLEMÃO) A.C.SM: ECOLOGIA DE POPULAÇÕES.....	14
2.5	<i>AMBURANA CEARENSIS</i> (ALLEMÃO) A.C.SM: FILOGEOGRAFIA.....	15
3	ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DE <i>AMBURANA CEARENSIS</i> (ALLEMÃO) A.C.SM., LEGUMINOSAE MADEIREIRA EM PERIGO DE EXTINÇÃO.....	17
4	PERFUMADA AO DIA E À NOITE: VOLÁTEIS FLORAIS EM <i>AMBURANA CEARENSIS</i> (FABACEAE) E SUA RELAÇÃO COM VISITANTES FLORAIS.....	41
5	ESTRUTURA DIAMÉTRICA E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE <i>AMBURANA CEARENSIS</i> (ALLEMÃO) A.C. SM. (FABACEAE) EM ÁREAS DE CAATINGA.....	66
6	FILOGEOGRAFIA DA LEGUMINOSA MADEIREIRA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO <i>AMBURANA CEARENSIS</i> (FR. ALLEM.) A.C. SMITH ESTIMADA COM MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSRN/ SSRCP)...	87
7	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE EM EXTINÇÃO <i>AMBURANA CEARENSIS</i> (LEGUMINOSAE).....	101
8	CONCLUSÕES.....	118
	REFERÊNCIAS.....	119
	ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PLANT BIOLOGY.....	124
	ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PHYTOCHEMISTRY.....	125
	ANEXO C – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO BIOLOGICAL CONSERVATION.....	126

ANEXO D - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO MOLECULAR ECOLOGY.....	127
ANEXO E – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO BRAZILIAN JOURNAL OF BOTANY.....	128

1 INTRODUÇÃO

O estudo multidisciplinar da autoecologia de espécies em perigo ou ameaçadas de extinção é de fundamental importância para elaboração de estratégias e planos de manejo com vista a conservação dessas espécies. Diante deste contexto, o presente estudo objetivou investigar as estratégias reprodutivas, a ecologia de populações e a filogeografia de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Sm., (Fabaceae), espécie típica de caatinga em perigo de extinção, a fim de subsidiar estratégias conservacionistas para manutenção desta espécie em sua área de ocorrência natural.

A tese foi estruturada em duas partes principais, a fundamentação teórica e cinco capítulos detalhados em sequência. A fundamentação traz aspectos gerais do táxon estudado e a importância dos diferentes enfoques de pesquisa aqui abordados tendo em vista as informações disponíveis para *A. cearensis*. No primeiro capítulo, intitulado “Estratégias reprodutivas de *Amburana cearensis*, Leguminosae madeireira em perigo de extinção”, é explorado as características reprodutivas por meio da descrição da biologia floral, incluindo aspectos morfológicos e recursos florais; do sistema de polinização indicando os principais agentes polinizadores e sua contribuição para o sucesso reprodutivo de acordo com o período de antese; e do sistema de cruzamento tendo em vista possíveis barreiras à autogamia. Este capítulo será enviado para publicação ao periódico Plant Biology (Fator de impacto: 2.216; Qualis – A2)

O segundo capítulo, intitulado “Constituintes químicos voláteis das flores de *Amburana cearensis* (Leguminosae) e sua relação com os polinizadores”, aborda a interação entre o odor, atrativo floral de longas distâncias, e os visitantes florais de *A. cearensis*. Os principais compostos químicos do *bouquet* floral foram associados a frequência de visitas e discutidos à luz de prováveis preferências dos agentes polinizadores quanto a composição do odor floral. Neste estudo, uma provável relação entre odor e a síndrome de polinização é apontada pela maior frequência das mariposas sobre as flores, exibindo assim uma relação de preferência entre odor e mariposas sobre borboletas e abelhas. Este manuscrito será enviado para publicação ao periódico Phytochemistry (Fator de impacto: 3.205; Qualis – A1).

No terceiro capítulo, intitulado “Estrutura diamétrica e distribuição espacial de *Amburana cearensis* (Fabaceae) sob níveis de perturbação antrópica em área de Caatinga”, é apresentado um estudo demográfico onde foram avaliadas a estrutura populacional diamétrica e a distribuição espacial de *A. cearensis* sob dois graus de perturbação antrópica em áreas de caatinga. Foi observado que as populações apresentam distribuição de frequência das classes

diamétricas tendendo a forma de “j-invertido” em ambas as áreas, porém diferenças na densidade, altura dos indivíduos e distribuição espacial pode ser afetada quanto ao solo, a restrição hídrica e perturbação antrópica. Este artigo será enviado para publicação ao periódico *Biological Conservation* (Fator de impacto: 3.985; Qualis – A1).

No quarto capítulo, intitulado “Filogeografia da leguminosa madeireira ameaçada de extinção *Amburana cearensis* (Fabaceae)”, está sendo investigada a distribuição da variabilidade genética de *A. cearensis* ao longo do seu alcance geográfico, descrevendo o centro de origem da espécie e as prováveis rotas de dispersão através dos domínios da Caatinga, Cerrado e Chaco. Os dados serão então discutidos à luz da história evolutiva da Florestas Sazonalmente Secas e de estratégias de conservação da diversidade genética. Este capítulo será enviado para publicação ao periódico *Molecular Ecology* (Fator de impacto: 5.947; Qualis – A1).

O quinto e último capítulo intitulado “Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para *Amburana cearensis* (Leguminosae)”, aborda a construção e o teste do polimorfismo de marcadores microssatélites desenvolvidos para *A. cearensis* e seu uso como descritores da variabilidade genética dessa espécie. Foi observado que a maioria dos marcadores mostraram-se polimórficos sendo, portanto, úteis para estudos com abordagem genética e subsidiar assim estratégias de conservação. Esta nota será enviada para publicação ao periódico *Brazilian Journal of Botany* (Fator de impacto: B2; Qualis – 0.734).

Na parte final da tese, uma conclusão descreve resumidamente os principais achados da biologia reprodutiva, ecologia de populações e diversidade genética da espécie, relacionando-os aos pontos-chave descritos acima.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TÁXON ESTUDADO: GÊNERO E ESPÉCIE

Amburana Schwacke & Taub pertence à família Leguminosae, uma das maiores famílias de angiospermas e uma das principais do ponto de vista econômico (SOUZA; LORENZI, 2008). O gênero é composto atualmente por três espécies: *A. acreana*, que ocorre nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil, apenas no domínio fitogeográfico Amazônico, *A. cearensis*, que ocorre na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (LIMA, 2012) e *Amburana erythrosperma* Seleme, C.H.Stirt. & Mansano de ocorrência endêmica no sul da Chapada Diamantina, no estado da Bahia, Brasil (SELEME *et al.*, 2015). *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm., popularmente conhecida como cerejeira, amburana, imburana-de-cheiro, cumaru, é uma espécie arbórea que apresenta distribuição exclusivamente sul-americana, encontrando-se principalmente no Brasil, sendo também registrada no norte da Argentina e do Paraguai, na Bolívia e no sudeste do Peru em floresta seca (LEITE, 2005). O centro de distribuição da espécie é o nordeste brasileiro, sendo uma árvore típica da Caatinga, mas sua área de ocorrência no Brasil inclui também os estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Espírito Santo (ANDRADE-LIMA, 1989; LEITE, 2005).

É utilizada na medicina popular para diversos fins (*e.g.* anti-inflamatório e cicatrizante), tendo a eficácia de alguns de seus compostos já sido cientificamente comprovada (*e.g.* broncodilatador, neuroprotetor) (LEAL *et al.* 2005, 2006). O maior uso da espécie, no entanto, se dá por sua madeira, comercialmente conhecida como cerejeira, que apresenta alta durabilidade e é fácil de trabalhar, sendo bastante apreciada para diversos fins, especialmente a fabricação de mobiliário fino (RIZZINI 1978). Como consequência principalmente da exploração madeireira, além da perda de habitat, a espécie encontra-se atualmente em perigo de extinção (AMERICAS REGIONAL WORKSHOP 1998; IUCN 2012). Além disso, a regeneração natural de suas populações parece ser insuficiente, levando à necessidade de um efetivo plano de conservação para a espécie (AMERICAS REGIONAL WORKSHOP 1998).

2.2 AMBURANA CEARENSIS (ALLEMÃO) A.C.SM: BIOLOGIA REPRODUTIVA

O sucesso de programas de conservação biológica está intrinsecamente relacionado ao nível de conhecimento sobre a biologia das espécies e ecossistemas em questão. Dentre as diversas áreas de conhecimento necessárias para a tomada de decisões que tornem a conservação, regeneração ou manejo de uma espécie exitosos, está a biologia reprodutiva.

Dentro desse campo de conhecimento, a fenologia, a biologia floral, a ecologia da polinização e da reprodução são ferramentas úteis na análise da biologia reprodutiva de espécies vegetais. Tais ferramentas refinam a capacidade de manejar áreas naturais e degradadas para conservação e restauração (RAMIREZ 1997, 2006; QUESADA *et al.* 2003), provendo informações quanto ao modo como os genes se dispersam nas populações vegetais (MACHADO; LOPES 2004) e quanto à organização temporal dos recursos vegetais disponíveis no ambiente aos animais que delas dependem (NEWSTROM *et al.* 1994; MORELLATO 1995).

Apesar do seu reconhecido valor econômico, *Amburana cearensis* é descrita apenas quanto a alguns aspectos da biologia reprodutiva e estrutura populacional (LEITE, 2005). Havendo informações sobre a fenologia vegetativa e reprodutiva em trabalhos feitos ao nível de comunidade no Brasil (MACHADO *et al.*, 1997; AMORIM *et al.*, 2005) em vegetação de Caatinga e nos demais países sul-americanos onde ocorre, como na Bolívia (JUSTINIANO; FREDERICKSEN, 2000), em floresta seca, e no Paraguai (LÓPEZ, 1987), em floresta semidecídua.

Quanto à biologia floral, existe apenas a descrição da morfologia das flores em geral, sistema sexual e período de antese, enquanto para o sistema de polinização foram observados os visitantes florais da espécie sem a classificação da mesma em uma categoria descrita por Feagri e Pijl (1979) e para o sistema reprodutivo, nenhuma informação foi encontrada (LEITE, 2005), havendo somente registros da morfologia do fruto e tipo de dispersão da semente, que se dá por anemocoria (CUNHA; FERREIRA 2003; LEITE 2005; SILVA; RODAL 2009; KIILL; LIMA, 2011).

2.3 AMBURANA CEARENSIS (ALLEMÃO) A.C.SM: ODOR FLORAL

Animais polinizadores são atraídos pela cor ou odor das flores, sendo os voláteis florais sinais químicos considerados fundamentais nas interações planta-polinizador por aumentar a discriminação das cores pelos visitantes, melhorando a atenção para os estímulos visuais, e contribuindo, desta forma, para a formação da memória (FAEGRI; PIJL, 1979; WEISS, 1997; KUNZE; GUMBERT, 2001; DOBSON 2006, WILLMER 2011; VASSARIN; AMARAL-NETO, 2014). A maioria dos insetos, como abelhas e mariposas, tem uma excelente acuidade olfativa e aprendem a associar o odor floral à presença de recursos, aumentam sua fidelidade às flores e, conseqüentemente, a eficiência na transferência intraespecífica de pólen (DOBSON *et al.*, 2005; DUDAREVA; PICHERSKY, 2006; RAGUSO, 2008). Em plantas com antese noturna, o odor é apontado como o principal

atrativo de polinizadores, como mariposas e morcegos (FEAGRI; PIJL 1979; ENDRESS 1994; VARASSIN; AMARAL-NETO, 2014).

A quantidade e qualidade dos compostos produzidos pelas flores podem também variar ao longo da antese, podendo estar relacionado com o tipo de polinizador ativo no momento da produção do odor (MATILE; ALTENBURGER, 1988, HOBALLAH *et al.* 2005, WAELTI *et al.*, 2008; FENSKE; IMAIZUMI, 2016). Estes perfumes florais são produzidos em glândulas denominadas osmóforos (VOGEL, 1990), que podem ser encontradas em diferentes verticilos florais, como pétalas e sépalas (EFFMERT *et al.*, 2006; AGOSTINI *et al.*, 2014).

Amburana cearensis, objeto de estudo desta tese, é popularmente conhecida como “amburana de cheiro” devido a cumarina presente na casca e sementes (BITU *et al.*, 2015), contudo, suas flores também exalam aroma intenso durante o dia e a noite. Apesar da notável fragrância emitida pelas flores de *A. cearensis*, esta tese traz o primeiro estudo completo dos compostos orgânicos voláteis florais emitidos por esta espécie, apontando a localização dos osmóforos, o buquê floral, os principais compostos liberados ao longo da antese e sua importância para a atração dos polinizadores de diferentes guildas de polinizadores.

2.4 AMBURANA CEARENSIS (ALLEMÃO) A.C.SM.: ECOLOGIA DE POPULAÇÕES

Estudos sobre ecologia de populações relacionada à estrutura populacional, especialmente contendo informações sobre a distribuição espacial e a estrutura etária, são de fundamental importância para a conservação e o manejo de espécies vegetais, visto que permitem uma melhor compreensão das características gerais das espécies e dos fatores que influenciam sua estrutura e dinâmica populacional (RAMÍREZ; ARROYO, 1990; FANTINI *et al.*, 1992; MILTON *et al.* 1993; FONSECA *et al.* 2004).

A ausência dessas informações, aliada à falta de políticas públicas eficientes e operacionais para a conservação da natureza, aumentam o risco de extinção de populações naturais de espécies vegetais e animais. A espécie objeto do presente estudo, *Amburana cearensis*, como dito anteriormente, encontra-se ameaçada de extinção e pouca informação existe sobre a ecologia desta espécie, principalmente quanto à estrutura da população e à biologia reprodutiva, assim como nenhum dado sobre manejo ou silvicultura para esta espécie está disponível (LEITE 2005). Além disso, os habitats onde ocorre naturalmente, como a Caatinga, o Cerrado e a Mata Atlântica, encontram-se ameaçados pelo uso inadequado e insustentável da flora nativa (ver, WHITMORE, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002; MITTERMEIER *et al.* 2004; SAMPAIO 2010), apresentando-se como áreas "altamente

modificadas", devido aos desmatamentos, queimadas para ampliação de áreas de pastagens e agricultura.

O manejo de populações requer que identifiquemos o foco apropriado na história de vida que mais contribuirá para o crescimento de uma população ameaçada (BENTON; GRANT, 1999). Portanto, o estudo da ecologia de populações de *Amburana cearensis*, associado a protocolos sugerido por Ramos *et al.* (2004) de introdução da espécie em estádios iniciais de recuperação de florestas estacionais degradadas (tipo vegetacional onde ocorre naturalmente) subsidiará uma boa alternativa para estabelecer uma estratégia de conservação para esta espécie, como também para suprir com esta espécie nativa programas de reflorestamento desses ecossistemas em alto estágio de modificação.

2.5 AMBURANA CEARENSIS (ALLEMÃO) A.C.SM.: FILOGEOGRAFIA

Filogeografia é uma área de estudo que trata dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies estreitamente relacionadas (AVISE, 2000). Como uma subdisciplina da biogeografia, a filogeografia objetiva colocar, em um contexto temporal mais amplo, perspectivas ecogeográficas tradicionais que enfatizam o papel atual de pressões ecológicas na definição das distribuições espaciais dos organismos, buscando evidências sobre os processos atuais e históricos que influenciaram a variação genética observada atualmente nas populações (AVISE, 2000). Além disso, estudos filogeográficos podem orientar estratégias de manejo através da priorização de áreas de alta diversidade genética para conservação (BEMINGHAM; MORITZ, 1998). Neste tipo de estudo, são utilizados marcadores moleculares que apresentam variabilidade em nível individual e, quando o objetivo é estudar os padrões filogeográficos que governaram a distribuição de uma espécie, ambientes representando bem a área de distribuição geográfica que ela ocupa devem ser amostrados (FREITAS 2011).

Amburana cearensis apresenta distribuição exclusivamente sul-americana e sua variabilidade genética é expressa em inúmeros caracteres, os quais diferem de acordo com seu alcance geográfico, entretanto, não é possível definir exatamente onde tais diferenças ocorrem (LEITE 2005), sendo necessário o uso da filogeografia para esta análise. Não obstante, a espécie compôs a flora do Pleistoceno, sendo uma importante espécie na análise da hipótese do “Arco Pleistocênico”, que compreende uma provável rota migratória de um destacável grupo de tipos vegetacionais lenhosos remanescentes de mudanças climáticas ocorridas no Pleistoceno Superior, abrangendo a Caatinga e matas calcárias do sudeste brasileiro, até

alcançar regiões de florestas secas na Bolívia, Argentina, Paraguai e Peru (PRADO; GIBBS, 1993; PRADO 2000).

O estudo filogeográfico, portanto, não apenas irá prover informações para seleção de áreas com alta diversidade genética para preservação de uma espécie ameaçada de extinção típica de florestas estacionais, fortemente degradadas, como também será de grande importância para avaliar a hipótese do “Arco Pleistocênico”, ajudando a entender como se deu o possível processo de expansão e retração das florestas secas da América do Sul. Além disso, o estudo molecular futuros incluindo as outras espécies do gênero *Amburana* será de fundamental importância para relações filogenéticas destas com *Amburana cearensis* provendo informações de quão isoladas reprodutivamente encontra-se uma espécie da outra.

**3 ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DE *AMBURANA CEARENSIS* (ALLEMÃO)
A.C.SM., LEGUMINOSAE MADEIREIRA EM PERIGO DE EXTINÇÃO**

Elivania Conceição Barral¹, Laís Angélica Borges², Oswaldo Cruz Neto¹ & Ariadna Valentina Lopes^{1,3}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, Rua Prof. Nelson Chaves s/n, 50372-970, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Biológicas, 58397-000, Areia, Paraíba, Brasil.

³Autor para correspondência: avflopes@ufpe.br

Resumo

Perturbações antrópicas têm reduzido populações de espécies de plantas em ecossistemas naturais com consequentes efeitos negativos sobre a reprodução e sobre o status de conservação dessas espécies. O objetivo desse estudo foi entender as estratégias reprodutivas de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm., leguminosa arbórea típica da Caatinga em perigo de extinção, gerando informações para a conservação desta espécie. O estudo foi conduzido em área de Caatinga, onde foram realizadas observações e coletas de campo para avaliar os recursos florais, sistema de polinização e reprodução de *A. cearensis*. As flores são hermafroditas disponibilizam grãos de pólen, exibem estigmas receptivos e secretam néctar durante toda a antese que inclui um período noturno e diurno. Odor adocicado liberado pelas pétalas atrai várias espécies de lepidópteros, mais frequentes polinizadores, e alguns himenópteros, polinizadores raros. Alta razão pólen-óvulo e alta viabilidade polínica foram encontradas, sugerindo autoincompatibilidade. Uma baixa formação de frutos sob condições naturais tem sido atribuída a limitação polínica na espécie por excesso de geitonogamia. Além disso, a produção massiva de flores associada à autoincompatibilidade de ação tardia podem ser aspectos que têm limitado o sucesso reprodutivo da espécie. Diferenças na contribuição para a frutificação e na frequência de visitas florais favorecem a ocorrência de um sistema de polinização misto em *A. cearensis*. Tendo em vista o *status* de conservação da espécie e a dependência de vetores de polinização para a formação de frutos, a manutenção de populações de *A. cearensis* pode estar diretamente relacionada à conservação das espécies polinizadoras.

Palavras-chave: *Amburana cearensis*, autoincompatibilidade, Caatinga, geitonogamia, Leguminosae, limitação polínica

Introdução

A ação do homem, principalmente a exploração madeireira e abertura de áreas de pastagem na Caatinga, tem promovido a redução de áreas contínuas de vegetação, levando espécies aos *status* de vulneráveis ou em perigo de extinção (Andrade-Lima 1981, Casteletti *et al.* 2003, Giulietti *et al.* 2003, Leal *et al.* 2005). A redução de hábitat conduz a uma redução no número de indivíduos reprodutivos na população e, portanto, refletem uma diminuição de doadores de pólen e na quantidade de pólen depositado, além disso, pode levar a uma possível redução na abundância de polinizadores (Cascante *et al.* 2002, Cunningham 2000).

Programas de conservação biológica são de fundamental importância nestes casos e o estudo da autoecologia dessas espécies ameaçadas de extinção, no que diz respeito ao diagnóstico da biologia reprodutiva, pode ser crítico para o estabelecimento de tais estratégias, visto que tem consequências enormes sobre a viabilidade das populações (Schaal *et al.* 1998, Evans *et al.* 2000, Young *et al.* 2002, Evans *et al.* 2003). O sucesso reprodutivo pode ser afetado por diferentes fatores bióticos e abióticos dentre eles quantidade e movimento de polinizadores, fragmentação de habitat, disponibilidade de recursos, densidade de plantas e número de flores por planta (Zimmerman & Aide 1989, Kearns, Inouye & Waser 1998, Franceschinelli & Bawa 2000, Breed *et al.* 2015). Efeitos negativos no sucesso reprodutivo não apenas afetam a produção e qualidade das sementes (Spira 2001), como também em última instância promove a diminuição da variabilidade genética (Hamrick & Godt 1996, Young *et al.* 1996).

A família Leguminosae é uma das mais representativas, em número de espécies, na Caatinga (Queiroz 2006). Muitas espécies de Leguminosae têm sido relatadas como ameaçadas de extinção nos últimos anos (Kiill 2010; IUCN 2016). A espécie arbórea *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. é uma Leguminosae típica de Caatinga, encontra-se ameaçada de extinção (Americas Regional Workshop 1998; IUCN 2016) e apresenta reconhecido valor socioeconômico, devido ao fornecimento de madeira e produtos fitoterápicos, e valor biológico, pelas interações ecológicas nas quais está envolvida (*e.g.* Leal *et al.* 2005, 2006, Kill 2010, Catão *et al.* 2011, Bitu *et al.* 2015). Apesar de estar ameaçada de extinção, há lacunas sobre a biologia reprodutiva e o papel dos visitantes florais para a reprodução da espécie (Cunha & Ferreira 2003; Leite 2005; Silva & Rodal 2009; Kill 2010, Kiill & Lima 2011). A fim de melhorar planos de manejo existentes e futuros (Kiill & Lima 2011), o objetivo desse estudo é responder as seguintes perguntas: (a) qual o sistema de reprodução de *Amburana cearensis*?; (b) quais os principais vetores de pólen para

cruzamentos?; (c) há aspectos que resultem em efeitos negativos na produção de sementes na área estudada?; (d) quais as principais recomendações para futuros planos de manejo para esta espécie?

Material e métodos

Local de estudo e espécie estudada

O estudo foi realizado em uma área de Caatinga no município de Parnamirim (39° 31' O 8° 6' S), Pernambuco, Brasil, que está inserido na unidade geoambiental da Depressão Sertaneja, a qual apresenta vegetação basicamente composta por Caatinga Hiperxerófila com trechos de Floresta Caducifólia. O clima é do tipo Tropical Semiárido, com chuvas de verão entre novembro a abril e precipitação média anual de 431,8 mm (CPRM – Serviço Geológico do Brasil 2005). O local de estudo apresenta poucas propriedades em meio a caatinga e fica próximo a uma unidade de extração mineral, que segundo os moradores locais esteve ativa por cerca de seis anos.

Amburana Schwacke & Taub. pertence à família Leguminosae, uma das maiores famílias de angiospermas e inclusive uma das principais do ponto de vista econômico (Souza & Lorenzi 2008). O gênero é exclusivamente sul-americano e composto atualmente pelas espécies *Amburana acreana* (Ducke) A.C.Sm. e *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm (Leite 2005). Uma recente revisão do gênero, entretanto descreve uma nova espécie, *Amburana erythrosperma* Seleme, C.H.Stirt. & Mansano de ocorrência endêmica no sul da Chapada Diamantina, no estado da Bahia, Brasil (Seleme *et al.* 2015).

Amburana cearensis, popularmente conhecida como cerejeira, amburana, imburana-de-cheiro, cumaru, é uma espécie arbórea que ocorre principalmente no Brasil, sendo também registrada no norte da Argentina e do Paraguai, na Bolívia (Seleme *et al.* 2015) e no sudeste do Peru, em floresta seca (Leite 2005). O centro de distribuição da espécie é o nordeste brasileiro, sendo uma árvore típica da Caatinga (Andrade-Lima 1989; Leite 2005). É utilizada na medicina popular para diversos fins (*e.g.* anti-inflamatório e cicatrizante), tendo a eficácia de alguns de seus compostos já sido cientificamente comprovada (*e.g.* broncodilatador, neuroprotetor) (Leal *et al.* 2005, 2006, Bitu *et al.* 2015). O maior uso da espécie, no entanto, se dá por sua madeira, comercialmente conhecida como cerejeira, usada na fabricação de mobiliário fino (Rizzini 1978) e tanoaria (Catão *et al.* 2011). Como consequência principalmente da exploração madeireira, além da perda de habitat, a espécie encontra-se atualmente em perigo de extinção (Americas Regional Workshop 1998; IUCN 2016). Além

disso, a regeneração natural de suas populações parece ser insuficiente, levando à necessidade de um efetivo plano de conservação para a espécie (Americas Regional Workshop 1998).

Biologia floral

Trinta inflorescências, sendo duas por indivíduo, foram escolhidas aleatoriamente, marcadas em campo e acompanhadas durante cinco dias para contabilizar o número médio de botões por inflorescência e o número médio de flores abertas por dia, disponíveis para os visitantes florais. Essas inflorescências foram avaliadas no período de frutificação para registro do número de frutos formados sob condições naturais. O início e a duração da antese foram avaliados a partir de observações em campo de cinco botões em pré-antese marcados em indivíduos diferentes na área de estudo.

Flores previamente ensacadas foram utilizadas na análise da receptividade estigmática, usando solução de 0,25% de permanganato de potássio (KMnO₄; Robinsohn 1924). A identificação de regiões florais emissoras de odor foi feita pela imersão das flores em uma solução de vermelho neutro 1 % por 5 minutos (Vogel 1963). Além disso, dez flores foram expostas à uma atmosfera de hidróxido de amônio por 5 minutos e observadas quanto a presença de regiões de absorção de luz ultravioleta (Scogin *et al.* 1977). Outras 15 flores coletadas em campo e analisadas em laboratório foram observadas sob luz-ultravioleta em câmara escura para identificar regiões de reflectância de luz ultravioleta. A concentração de açúcares hidrossolúveis no néctar foi medida usando refratômetro de bolso 0-95% (Atago, Tokyo, Japan) a partir de 24 flores previamente ensacadas. Para isso o hipanto das flores foi seccionado longitudinalmente e carimbados no refratômetro para obter-se as medidas de concentração, visto que não foi possível coletar o néctar com microseringa.

O número de grãos de pólen por flor foi obtido a partir de cinco botões em pré-antese utilizando-se a Câmara de Neubauer (Maêda 1985). Para este procedimento, todas as anteras de uma flor foram imersas em solução de ácido láctico e glicerina na proporção 3:1, e tiveram seus grãos de pólen extraídos. A proporção 3:1 foi utilizada visto que em análise prévia cada antera possui cerca de 2 mil grãos de pólen (Cruden 1977). A solução contendo os grãos de pólen de cada flor foi homogeneizada e teve 1 ml transferido para a Câmara de Neubauer, a qual foi observada em microscópio para a contagem direta dos grãos na sub amostra. O número total de grãos de pólen por flor foi obtido pela extrapolação direta dos grãos presentes na sub amostra observada na Câmara de Neubauer. A viabilidade polínica foi verificada através do método de coloração do citoplasma com carmim acético 2% (Radford *et al.* 1974) a partir de cinco botões em pré-antese fixados em álcool 70%. Os primeiros 200 grãos de

pólen foram classificados em viáveis ou inviáveis, este processo foi feito para cinco anteras/flor. Paralelamente, os ovários de cada um dos cinco botões amostrados foram longitudinalmente seccionados para a contagem do número de óvulos e estimativa da razão pólen-óvulo (Cruden 1977).

Visitantes florais

O comportamento dos visitantes florais foi descrito a partir de observações em campo. Os visitantes foram classificados de acordo com a eficiência de polinização como: (1) polinizadores efetivos quando, em todas as visitas, houve contato com ambas as estruturas reprodutivas das flores; (2) polinizadores ocasionais quando ocasionalmente tocaram o estigma; ou (3) pilhadores quando o recurso floral foi coletado sem haver contato com a região estigmática. A frequência de visitas foi obtida a partir de 42 h (24 h diurnas e 18 h noturnas) de observações em plantas focais no período entre 00:00 h e 23:00 h, em sete dias não consecutivos. Visitantes florais foram também capturados, identificados e registrados por fotografia. Espécimes-testemunho foram depositados na coleção entomológica do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva da Universidade Federal de Pernambuco.

Sistema reprodutivo

Experimentos de polinização controlada foram feitos para avaliar a formação de frutos por agamospermia, autogamia e xenogamia segundo metodologia descrita por Radford *et al.* (1974). Os tratamentos incluíram: (1) agamospermia; (2) autopolinização espontânea, com isolamento das flores para impedir a visita de polinizadores; (3) autopolinização manual, com flores recebendo pólen da mesma flor; e (4) polinização cruzada manual, com flores recebendo pólen de flores de outros indivíduos. As flores foram ensacadas durante a fase de pré-antese para impedir a ação de visitantes florais e emasculadas nos tratamentos de agamospermia e polinização cruzada manual para evitar a transferência de pólen endógeno para o estigma. Após o período de 30 dias os resultados das polinizações controladas foram coletados. Inflorescências marcadas em campo e acompanhadas por 5 dias foram avaliadas ao final da floração para registro do número de frutos formados sob condições naturais. A eficácia reprodutiva foi determinada de acordo com Zapata & Arroyo (1978) através da razão entre as porcentagens de frutos formados por polinizações naturais e por polinizações cruzadas manuais e o índice de autoincompatibilidade (IAI ou ISI em inglês) foi calculado segundo Bullock (1985) através da razão entre a porcentagem de frutos formados por autopolinização manual e a de frutos formados por polinização cruzada manual.

Além dos cruzamentos manuais, o sistema reprodutivo de *A. cearensis* foi também investigado pela dinâmica de crescimento de tubos polínicos. Neste caso, botões em pré-antese coletados em campo e posto em caixas plásticas Gerbox de 250 ml contendo ágar foram usados para verificar crescimento de tubo polínico em tratamentos de autopolinização espontânea, autopolinização manual, polinização cruzada entre flores do mesmo indivíduos e polinização cruzada entre flores de indivíduos diferentes, seguindo a metodologia descrita acima para as polinizações controladas, contudo realizadas em laboratório. Os pistilos foram coletados e fixados em FAA 70% após 12, 24 e 48 horas da realização das polinizações. Aproximadamente, 15 pistilos de cada tratamento foram montados em lâmina com azul de anilina e analisados sob microscopia de fluorescência (Martin 1959) quanto à presença/ausência de tubos polínicos no pistilo, a quantidade de tubos polínicos que alcançaram o óvulo e quanto ao número de óvulos que apresentaram tubos polínicos.

Eficiência dos visitantes florais

Sessenta flores (5 por indivíduo) durante a fase de pré-antese foram ensacadas para impedir a ação de visitantes no botão floral. No início da noite, às 18:00 h, 30 das flores previamente ensacadas foram expostas aos visitantes noturnos, e então re-ensacadas durante o dia, a partir das 05:00 h. As 30 flores restantes foram então expostas às 05:00 h para os visitantes diurnos e re-ensacadas às 17:30 h para evitar visitas dos polinizadores noturnos. Ao final do experimento de exposição seletiva, ou seja, após o término do período de antese dessas flores, as mesmas foram deixadas expostas em campo e os resultados coletados após 30 dias.

Análises estatísticas

Para verificar diferenças significativas nos resultados obtidos na análise dos tubos polínicos e no experimento de exposição seletiva aos polinizadores foi realizado o teste não-paramétrico qui-quadrado (χ^2) para um nível de significância (α) de 5% (Sokal & Rohlf 1995, Zar 2010). Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do programa BioEstat v.5.3 (Ayres *et al.* 2007).

Resultados

Biologia floral

Ramos reprodutivos foram emitidos na estação seca da área de estudo por aproximadamente um mês. As inflorescências são compostas do tipo panícula e apresentam em média 41 ± 26 botões florais, dos quais 10 ± 6 botões abrem diariamente. A antese é crepuscular, inicia-se às 16:00 h e se estende até às 15:00 h do dia seguinte. O processo de abertura floral corresponde a uma distensão inicial da única pétala seguida de um leve arqueamento para trás da sua borda e elevação dos estames heterânteros que acompanham a curvatura do pistilo (Figura 1). Esse processo de abertura dura cerca de duas horas e pode ocorrer em outros horários do dia, contudo, para um número menor de botões. O estigma encontra-se receptivo durante toda a antese e algumas anteras estão deiscentes desde o processo de abertura floral.

As flores são zigomorfas, hermafroditas, não apresentam coloração na faixa do ultravioleta e variam entre tons de branco e rosa (Figura 2). Apresentam um cálice curto e longo hipanto, no qual o néctar é secretado por estômatos nectaríferos. A concentração do néctar variou de 6 a 36% com média de $23,18\% \pm 10,60$. Possíveis regiões emissoras de odor foram localizadas na borda da pétala e um aroma adocicado intenso é emitido durante toda a antese. As flores possuem em média 35.575 ± 16.935 grãos de pólen e a quantidade de óvulos varia de 2 a 4 por carpelo. Alta razão pólen-óvulo (17.787 ± 8.467 grãos de pólen/flor) e alta viabilidade polínica ($97,65\% \pm 2,09$) foram encontradas.

Visitantes florais

As visitas às flores tiveram início com a antese, às vezes com o processo de abertura floral, entretanto florívoros e pilhadores de pólen foram observados desde o estágio de botão. Visitantes florais pertencentes a 28 espécies foram registrados, dentre eles espécies de Lepidoptera (18 spp.), Hymenoptera (6 spp.), Coleoptera (2 spp.), Diptera (1 spp.) e Apodiformes: Trochilidae (1 spp.) (Tabela 1). Quanto às 21 espécies polinizadoras, dez foram registradas apenas durante o dia, com exceção da borboleta *Strymon rufofusca* (Hewitson, 1877), e onze predominantemente à noite, das quais quatro (incluindo a espécie de mariposa *Virbia* sp. (Walker, 1854) foram registradas esporadicamente fora do período noturno da antese de *A. cearensis* (Tabela 2).

Duas espécies de mariposa e todas as abelhas foram consideradas polinizadores efetivos, sendo os demais lepidópteros considerados polinizadores ocasionais (Tabela 2).

Vespas, coleópteros e moscas foram considerados principalmente como pilhadores de pólen/néctar ou promotores de outras interações como florivoria, predação e oviposição. Uma espécie de beija-flor (*Phaethornis* cf. *petrei*) foi registrada nas flores de *A. cearensis*, estritamente pela manhã. Devido as visitas esporádicas em baixíssima frequência deste visitante floral, não foi possível determinar o comportamento de visita e, portanto, classificá-lo como polinizador ou pilhador de néctar.

As espécies polinizadoras efetivas geralmente pousam na pétala estandarte e contatam o estigma e as anteras com a cabeça ou o tórax na porção dorsal do corpo, à exceção da espécie de Halictidae, na qual o contato ocorre na porção dorsal do abdômen. Para os polinizadores ocasionais a região de contato com as estruturas reprodutivas variou muito, desde as pernas, espirotromba, cabeça, abdômen e tórax. Mariposas e borboletas em conjunto são responsáveis por 93,68% das visitas às flores, enquanto os himenópteros representam 6,32% dessas visitas (Tabela 2).

Sistema reprodutivo

A formação de frutos de *A. cearensis* ocorreu apenas por meio de polinização natural e foi menor que 2%. Neste caso, tanto nos cruzamentos de autopolinização manual, autopolinização espontânea e polinização cruzada (entre flores do mesmo indivíduo e indivíduos diferentes) não foi registrada a formação de frutos (Tabela 3). Quanto ao experimento de exposição seletiva, apenas no conjunto de flores expostas aos polinizadores diurnos, houve formação de fruto com 3,3% de eficiência (Tabela 3).

Tubos polínicos foram observados germinando e crescendo nos pistilos analisados sob microscopia óptica de fluorescência. Nos tratamentos de autopolinização manual, polinização cruzada entre flores do mesmo indivíduo e polinização cruzada entre flores de indivíduos diferentes foram registradas a presença de tubos polínicos inclusive penetrando o óvulo (Tabela 4). Tubos polínicos se comportaram de forma semelhante em pistilos com polinização cruzada entre flores do mesmo indivíduo e entre indivíduos diferentes nos todos os horários, não havendo diferença significativa na frequência de óvulos penetrados por tubos polínicos oriundo de ambos os tipos de polinização cruzada nos tratamentos 12 h ($\chi^2 = 0,91$; $p = 1$) e 24 h ($\chi^2 = 0,131$; $p = 0,9107$) após polinizações manuais.

Através dos resultados dos experimentos de polinização controlada a eficácia reprodutiva (ER, *sensu* Zapata & Arroyo 1978) e o índice de autoincompatibilidade (ISI, *sensu* Bullock 1985) foram iguais a zero.

Discussão

A floração de *A. cearensis* ocorreu ao final da estação chuvosa, como observado em outros estudos (Machado *et al.* 1997, Amorim *et al.* 2009, Kiill 2010, 2012) e os recursos florais constituem uma importante fonte de alimento para os polinizadores no início da estação seca em Parnamirim-PE. O néctar é o principal recurso floral para os polinizadores como as mariposas, borboletas e abelhas, enquanto o pólen é procurado pelos pilhadores, como pequenos coleópteros curculionídeos. Além disso, por apresentar uma floração curta e intensa atrai uma ampla gama de lepidópteros, que ao forragearem por néctar nas flores de *A. cearensis* são predados por pássaros ou aranhas (obs. pessoal). Como descrito, a espécie imburana-de-cheiro tem grande papel ecológico e sua contribuição como fonte alimentar e abrigo para entomofauna tem sido observada (Kiill 2010, Kiill & Lima 2011). Em adição, recentemente seu potencial para recuperação de áreas degradadas, devido a sua importância para atividade apícola, tem sido estudado (Modro *et al.* 2016).

As inflorescências congestas disponibilizam um número razoável de flores diariamente que permanecem no ramo floral por três dias após a antese, contribuindo assim para o aumento do display floral. Grandes displays florais promovem maior número de visitas através do aumento na atração de polinizadores, contudo podem favorecer cruzamentos por geitonogamia diminuindo o sucesso reprodutivo masculino através da redução na transferência de pólen entre plantas distintas (Klinkhamer *et al.* 1989, Harder & Barrett 1995, 1996, Karron *et al.* 2004). As espécies polinizadoras de *A. cearensis*, entretanto, comumente evitam flores em senescência e visitam poucas flores por inflorescência, dessa forma a manutenção de flores em senescência tem como principal papel a atração a longas distâncias dos polinizadores. Em ação conjunta ao display floral, características como o odor facilitam a localização da planta para os visitantes florais (Williams 1983, Dobson 1987) como o odor intenso e adocicado liberado pela pétala durante toda a antese, funcionando também como recurso atrativo a longa distância.

As características florais de *A. cearensis* a colocam como falenófila, ou seja, na síndrome de polinização por mariposas segundo Faegri & Pijl (1979). Suas flores apresentam um curto hipanto, pétalas que geralmente tem coloração pálida, secretam néctar e liberam um aroma intenso e adocicado. A polinização por mariposas pode ser observada em outras espécies de Fabaceae (Koptur 1983, Bawa 1990, Souza & Funch 2015). Independente do horário de visitas os lepidópteros, representados por 18 espécies incluindo mariposas e borboletas, foram os polinizadores mais frequentes das flores de *A. cearensis*, ao contrário do

encontrado por Kill (2010), para qual duas espécies de mariposas foram os principais visitantes florais noturnos e os himenópteros, com destaque para as abelhas, os mais frequentes visitantes durante o período diurno. Vale ressaltar que as mariposas foram os mais abundantes em número de espécies (13 spp.) e os mais frequentes perfazendo 82,18% das visitas de lepidópteros em contrapartida às cinco espécies de borboletas que totalizaram 17,82% da frequência de visitas feita por Lepidoptera. Tal dado afirmaria um sistema de polinização por mariposas corroborando a síndrome falenófila exibida pelas flores desta Leguminosae.

As abelhas foram pouco frequentes nas flores de *A. cearensis*, representando 6,5 % das visitas, apesar de se comportarem como polinizadores efetivos. Ainda que baixas taxas de visitação tenham sido registradas na área de estudo, outras áreas de Caatinga têm mostrado mariposas e as abelhas sem ferrão como principais polinizadores, com estas últimas responsáveis por 76,05% das visitas (Kiill 2010). De acordo com Butler (1945) em estudo sobre a atividade de “*honeybees*”, estas tem visitado preferencialmente flores que produzem néctar mais concentrado quando espécies melitófilas estão em sincronia de floração. O fato das flores não apresentarem coloração nem guia com pigmento ultravioleta e produzirem néctar pouco volumoso e com baixa concentração de açúcares (ca. 30 – 40% para “*honeybees*”, Roubik *et al.* 1995), provavelmente deve estar influenciando a preferência destes visitantes por flores que apresentem características mais compensatória sobre o custo/benefício do seu forrageio na área de pesquisa.

A história evolutiva da interação entre flores e animais pode ser melhor entendida por meio de uma análise conjunta da frequência e eficiência dos polinizadores quanto às taxas de frutificação (Stebbins 1970, Thomson & Wilson 2008). Os visitantes florais diurnos de *A. cearensis* apresentaram maior contribuição para a formação de frutos em relação às espécies noturnas de acordo com o experimento de exclusão de polinizadores. Portanto, é possível caracterizar a ocorrência de um sistema de polinização misto em *A. cearensis*, no qual as flores são adaptadas às mariposas, mas também recebem visitas eficientes de abelhas. A contribuição de polinizadores diurnos e noturnos para espécies que apresentem antese com possibilidade de um sistema de polinização misto é variável e pode ser concordante com a síndrome de polinização (*e.g.* Groman & Pellmyr 1999, Young 2002, Amorim *et al.* 2013) ou discordante (Giménez-Benavides *et al.* 2007) ou mesmo complementar (Amorim *et al.* 2013).

Quanto ao sistema de cruzamento, *Amburana cearensis* formou frutos apenas nas polinizações naturais. Dentro de leguminosas muitas espécies arbóreas apresentam baixo índice de formação de frutos sob condições naturais (Bawa & Buckley 1989, Freitas &

Oliveira 2002, Leite & Machado 2009, Barros *et al.* 2013, Freire *et al.* 2013) e o reduzido número de frutos tem sido associado a diferentes causas (Freitas & Oliveira 2002), dentre eles a autoincompatibilidade, limitação polínica e uma limitação na alocação de recursos (Stephenson 1981, de Oliveira e Sazima 1990, Burd 1994, Parra-Tabla & Bullock 1998, Pansarin 2003, Amorim *et al.* 2013). A limitação polínica, pela promoção de fluxo inviável de pólen, também deve estar ocorrendo na população estudada de *A. cearensis*.

A análise parcial dos tubos polínicos mostrou que grãos de pólen de origem autógama e xenógama são capazes de germinar e penetrar os óvulos. Poucos tubos foram observados penetrando a micrópila do óvulo em pistilos submetidos a autopolinizações manuais, enquanto que tubos oriundos de polinizações cruzadas entre flores do mesmo indivíduo e polinizações cruzadas entre flores de indivíduos distintos foram abundantes. Mesmo não havendo diferença significativa entre a maioria dos tratamentos de tubo polínico, a baixa produção de frutos sob condições naturais pode indicar a ocorrência de autoincompatibilidade de ação tardia. Muitas espécies têm mostrado este mecanismo de autoesterilidade, que não impede a germinação dos grãos de pólen, crescimento do tubo polínico e até mesmo penetração dos óvulos e tem sido relacionado a baixa formação natural de frutos (Freitas & Oliveira 2002, Oliveira *et al.* 2004, Borges *et al.* 2009, Leite & Machado 2010, Amorim *et al.* 2013). Além disso, outras características como a elevada razão pólen/óvulo (*sensu* Cruden 1977) e o índice de autoincompatibilidade igual a zero (segundo Bullock 1985), enquadram *Amburana cearensis* como autoincompatível.

A produção massiva de flores de *A. cearensis* em curto período de tempo parece estar promovendo limitação polínica devido ao fluxo de pólen entre flores do mesmo indivíduo, diminuindo assim o sucesso reprodutivo masculino através da perda de pólen para polinização cruzada. Esse tipo de floração associada à autoincompatibilidade tem resultado na baixa produção de frutos em condições naturais, reduzindo, portanto, o *fitness* feminino da espécie na área de estudo. Não obstante, os frutos produzem uma ou raramente duas sementes. Assim, a baixa formação de frutos pode resultar numa produção de sementes incompatível com a manutenção da densidade de indivíduos na população. Embora o comportamento dos visitantes florais, a floração intensa e o sistema de autoincompatibilidade tenham contribuído para um baixo sucesso reprodutivo, tendo em vista o status de conservação da espécie, a manutenção de populações de *A. cearensis* pode estar diretamente relacionada à conservação das espécies polinizadoras, as quais são as únicas responsáveis pela formação de frutos na espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brasil) pela bolsa concedida a E.C. Barral, ao Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pela identificação de família e gênero dos lepidópteros, ao Prof. Dr. Lucas Kaminski da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela identificação das espécies de Lycaenidae e a Eurico Lustosa e equipe da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim (EAIP) – UFRPE, Brasil pela estrutura e apoio no trabalho de campo.

Referências

- Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica). 1998. *Amburana cearensis*. In: IUCN 2007 Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 March 2008.
- Amorim, I.; Sampaio, E.V.S.B. & Araújo, E.L. 2005. Flora e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 19(3): 615-623.
- Amorim, F.W., Galetto, L. & Sazima, M. 2013. Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology* 15: 317–327.
- Andrade-Lima, D. 1981. The caatingas dominium. *Revista Brasileira de Botânica* 4: 149-153.
- Andrade-Lima, D. 1989. Plantas das Caatingas. Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro.
- Barros, E.C.O., Webber, A.C. & Machado, I.C. 2013. Limitação de polinizadores e mecanismo de autoincompatibilidade de ação tardia como causas da baixa formação de frutos em duas espécies simpátricas de *Inga* (Fabaceae – Mimosoideae) na Amazônia Central. *Rodriguésia* 64(1): 037-047.
- Bawa, K.S. & Buckley, D.P. 1989. Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae. In: *Advances in legume biology*. (C.H. Stirton & J.L. Zarucchi, eds.). *Monographs in Systematic Botany*, Missouri Botanical Gardens 29:243-262.
- Bitu, V.C.N., Bitu, V.C.N., Matias, E.F.F., Lima, W.P., Portelo, A.C., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A. 2015. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public Markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 172: 265–272.

- Breed, M.F., Ottewell, K.M., Gardner, M.G., Marklund, M.H.K., Dormontt, E.E. & Lowe, A.J. 2015. Mating patterns and pollinator mobility are critical traits in forest fragmentation genetics. *Heredity* 115: 108–114.
- Borges, L.A., Sobrinho, M.S. & Lopes, A.V. Phenology, pollination, and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), and a review of studies on the reproductive biology in the genus. *Flora* 204: 111-130.
- Bullock, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 17: 287-301.
- Burd, M. 1994. Bateman's principle and plant reproduction: The role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review* 60(1): 83-139.
- Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J.J. & Fuchs, E.A. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology* 16(1): 137–147.
- Castelletti, C. H. M., J. M. C. Silva, M. Tabarelli, e A. M. M. Santos. 2003. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. Pp 91–100 in J. M. C. Silva, M. Tabarelli, M. Fonseca e L. Lins, editores. *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Catão, C. G., Paes, J. B., Gomes, J. P. & Araújo, G. T. 2011. Qualidade da madeira de cinco espécies florestais para o envelhecimento da cachaça. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 15(7): 741–747.
- CPRM – Serviço Geológico do Brasil 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Parnamirim, estado de Pernambuco. Org(s) J.C. Mascarenhas, B.A. Beltrão, L.C. Souza Junior, M.J. T. G. Galvão, S.N. Pereira, J. L. F. Miranda. Recife: CPRM/PRODEEM, 2005.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Cunha, M.C.L. & Ferreira, R.A. 2003. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith - cumaru - Leguminosae Papilionoideae. *Revista Brasileira de Sementes* 25(2): 89-96.
- Cunningham, S. A. 2000. Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proceedings of the Royal Society of London* 267: 1149–1152.
- De Oliveira, P.E.A.M. & Sazima, M. 1990. Pollination biology of two species of *Kielmeyera* (Guttiferae) from Brazilian cerrado vegetation. *Plants Systematics and Evolution* 172: 35-49.

- Dobson, H.E.M. 1987. Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia* 72: 618-623.
- Evans, M.E.K., Dolan, R.W., Menges, E.S. & Gordon, D.R. 2000. Genetic diversity and reproductive biology in *Warea carteri* (Brassicaceae), a narrowly endemic florida scrub annual. *American Journal of Botany* 87(3): 372–381.
- Evans, M.E.K., Menges, E.S. & Gordon, D.R. 2003. Reproductive biology of three sympatric endangered plants endemic to Florida scrub. *Biological Conservation* 111: 235–246.
- Faegri, K. & Pijl, L. van der. 1979. The principles of pollination ecology. Oxford. Pergamon Press.
- Franceschinelli, E.V. & Bawa, K.S. 2000. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity* 84: 116-123.
- Freire, J.M., Azevedo, M.N., Cunha, C.F., Silva, T.F. & Resende, A.S. 2013. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em área fragmentada de Mata Atlântica em Itaboraí, RJ. *Pesquisa florestal brasileira, Brazilian Journal of Forestry Research* 33(75): 243-252.
- Freitas, C.V. & Oliveira, P.E. 2002. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25(3): 311-321.
- Giménez-Benavides, L., Dötterl, S., Jürgens, A., Escudero, A. & Iriondo, J.M. 2007. Generalist diurnal pollination provides greater fitness in a plant with nocturnal pollination syndrome: assessing the effects of a *Silene* - *Hadena* interaction. *Oikos* 116: 1461-1472.
- Giulietti, A.M. et al. 2004. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: Cardoso, J. M. da Silva; Tabarelli, M.; Fonseca, M. T. Da; Lins, L. V. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, p. 47 – 90.
- Groman, J.D. & Pellmyr, O. 1999. The pollination biology of *Manfreda virginica* (Agavaceae): relative contribution of diurnal and nocturnal visitors. *Oikos* 87(2): 373-381.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 351: 1291–1298.
- IUCN The Red List of Threatened Species. Version 2016-2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 19 September 2016.
- Justiniano, M.J. & Fredericksen, T.S. 2000. Phenology of tree species in bolivian dry forest. *Biotropica* 32(2): 276-281
- Karron, J.D., Mitchell, R.J., Holmquist, K.G., Bell, J.M. & Funk, B. 2004. The influence of floral display size on selfing rates in *Mimulus ringens*. *Heredity* 92: 242–248.

- Kearns, C.A., Inouye, D.W. & Waser, N.M. 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112
- Kiill, L.H.P. 2010. Plantas da Caatinga ameaçadas de extinção e sua associação com polinizadores. In: *Semana dos Polinizadores*, 2. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010 p. 59-71.
- Kiill, L.H.P. & Lima, P.C.F. 2011. Plano de manejo para espécies da caatinga ameaçadas extinção na reserva legal do projeto salitre. In: Embrapa Semiárido. Documentos, 243. (Silva, S.A., ed.). Petrolina: Embrapa Semiárido, 55p.
- Kiill, L.H.P. 2012. Fenologia reprodutiva e dispersão das sementes de quatro espécies da caatinga consideradas como ameaçada de extinção. *Informativo Abrates* 22(3): 12-15.
- Klinkhamer P.G.L. & de Jong T.J. 1990. Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Oikos* 57: 399–405.
- Koptur, S. 1983. Flowering phenology and floral biology of *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae). *Systematic Botany* 8(4): 354-368.
- Leal, L.K.M., Costa, M.F., Pitombeira, M., Barroso, V.M., Silveira, E.R., Canuto, K.M. & Viana, G.S.B. 2006. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. *Life Science* 79(1): 98-104.
- Leite, E.J. 2005. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr.Allem.) A.C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. *Journal for Nature Conservation* 13: 49-65.
- Leite, A.V. & Machado, I.C. 2009. Biologia reprodutiva da “catingueira” (*Caesalpinia pyramidalis* Tul., Leguminosae-Caesalpinioideae), uma espécie endêmica da Caatinga. *Revista Brasileira de Botânica* 32(1): 79-88.
- Leite, V.G., Teixeira, S.P., Mansano, V.F. & Prenner, G. 2015. Floral development of the early-branching Papilionoid legume *Amburana cearensis* (Leguminosae) reveals rare and novel characters. *International Journal of Plant Sciences* 176(1): 94-106.
- Lima, H.C. de 2015. *Amburana* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22780>). Acesso em: 19/09/2016.
- López, J. A. 1987. Árboles comunes del Paraguay. Ñande Yvira´ Mata Kuera, Cuerpo de Paz, Asunción.
- Machado, I.C.; Barros, L.M. & Sampaio, E.V.S.B. 1997. Phenology of caatinga species at Serra Talhada – PE, Northeastern Brazil. *Biotropica* 29(1): 57-68.

- Maêda, J.M. 1985. Manual para uso da câmara de Newbauer para contagem de pólen em espécies florestais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Departamento de Silvicultura. Seropédica.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34:125-128.
- Modro A.F.H., Biazatti, S.C., Dalazen, A.P., Ferronato, M.L. & Maia, E. 2016. Espécies florestais com potencial apícola utilizadas para recuperação de áreas degradadas na Zona da Mata Rondoniense. *Cadernos de Agroecologia*, [S.l.] 10(3). ISSN 2236-7934. (<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/cad/article/view/19544>). Acesso em: 06/02/2018.
- Pansarin, E.R. 2003. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26(2): 203-211.
- Parra-Tabla V. & Bullock, S.H. 1998. Factors limiting fecundity in the tropical tree *Ipomoea wolcottiana* (Convolvulaceae). *J. Trop. Ecol.* 14: 615-627.
- Oliveira, P.E. Gibbs, P.E. & Barbosa, A.A. 2004. Moth pollination of woody species in the Cerrados of Central Brazil: a case of so much owed to so few? *Plant Systematics and Evolution* 245: 41–54.
- Pennington RT, Lavin M, Prado DE, Pendry CA, Pell S, et al. 2004. Historical climate change and speciation: Neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. *Philos. Trans. R. Soc. Ser. B* 359:515–38.
- Radford, A.E., Dickinson, W.C., Massey, J.R., & Bell, C.R. 1974. Vascular plant systematic, pp. 891. Harper & Row Publishers, New York. *Plant Systematics Evolution* 194: 55-67.
- Rizzini, C.T. 1978. Árvores e madeiras úteis do Brasil. Editora Edgar Blücher LTDA. São Paulo.
- Robinson, I. 1924. Die farbungreaktion der narbe, stigmatochromie, als morpho-biologische Blütenuntersuchungsmethode. *Sitzungsberichten Akademischer Wissenschaft Wien, Mathematics, Abteilung* 133:180-213.
- 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.
- Scogin, R., Young, D.A. & Jones, C.E. 1977. Anthochlor pigments and pollination biology: II. The ultraviolet patterns of *Coreopsis gigantea* (Asteraceae). *Bull. Torrey Bot. Club* 104: 155-159.

- Seleme, E.P., Lewis, G.P., Stirton, C.H., Sartori, A.L.B. & Mansano, V.F. 2015. A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa* 212 (4): 249–263.
- Silva, M.C.N.A. & Rodal, M.J.N. 2009. Padrões das síndromes de dispersão de plantas em áreas com diferentes graus de pluviosidade, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23(4): 1040-1047.
- Spira, T.P. 2001. Plant-pollinator interactions: a threatened mutualism with implications for the ecology and management of rare plants. *Natural Areas Journal* 21: 78–88.
- Stephenson, A.G. 1981. Flower and Fruit Abortion: Proximate Causes and Ultimate Functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 253-279.
- Thomson, J.D. & Wilson P. 2008. Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence and directionality. *International Journal of Plant Science* 169: 23-38.
- Vogel, S. 1963. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung. Über Bau und Funktion der Osmophoren. *Akad. Wiss. Lit. Abh. Math.-Natur. Kl. 10*: 601–763.
- Williams, N.H. & Whitten, W.M. 1983. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: Methods and advances in the last sesquidecade. *Biological Bulletin* 164:355-395.
- Young, A., Boyle T. & Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecology Evolution* 11: 413–418.
- Young, H.J. 2002. Diurnal and nocturnal pollination of *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 89(3): 433–440.
- Young, A.G., Hill, J.H., Murray, B.G. & Peakall R. 2002. Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the subalpine forb *Rutidosia leiolepis* F. Muell. (Asteraceae). *Biological Conservation* 106: 71–78.
- Zapata, T.R. & Arroyo, M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221-230.
- Zimmerman, J.K. & T. Aide, M. 1989. Patterns of Fruit Production in a Neotropical Orchid: Pollinator vs. Resource Limitation. *American Journal of Botany* 76(1): 67-73.

Lista de tabelas

Tabela 1. Relação de espécies visitantes florais de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae) em uma área de Caatinga no município de Parnamirim sertão de Pernambuco, Brasil.

Ordem	Família
	Espécie
APODIFORMES	TROCHILIDAE
	<i>Phaethornis</i> cf. <i>pretrei</i> (Lesson & Delattre, 1839)
DIPTERA	CALLIPHORIDAE
	<i>Lucilia</i> sp.
HYMENOPTERA	APIDAE
	<i>Apis mellifera</i> (Linnaeus, 1758)
	<i>Centris</i> (<i>Aphemisia</i>) sp. (Ayala, 2002)
	VESPIDAE
	<i>Ancistrocerus</i> spp. (Wesmael, 1836)
LEPIDOPTERA	HESPERIIDAE
	<i>Panoquina</i> sp. (Hemming, 1934)
	<i>Polythrix</i> sp. (Watson, 1893)
	LYCAENIDAE
	<i>Electrostrymon endymion</i> (Fabricius, 1775)
	<i>Strymon cestri</i> (Reakirt, 1867)
	<i>Strymon rufofusca</i> (Hewitson, 1877)
	<i>Strymon</i> sp. (Hübner, 1818)
	NOCTUIDAE
	<i>Ctenucha</i> sp. (Kirby, 1837)
	<i>Virbia</i> sp. (Walker, 1854)

Tabela 2. Comportamento e frequência dos visitantes florais de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae) no município de Parnamirim sertão de Pernambuco. PE= Polinizador efetivo; PO= Polinizador ocasional; PI= Pillhador; N= Número de espécies; Fr. Abs.= Frequência absoluta; - não foi possível classificar.

Visitante floral	Comportamento	N	Fr. Abs.
LEPIDOPTERA			
Mariposas		13	475
Diurna	PE/PO	1/1	123
Noturna	PE/PO	1/10	352
Borboletas	PO	5	103
HYMENOPTERA			
Abelhas	PE	3	39
Vespas	PI	3	10
DIPTERA			
Mosca	PI		1
APODIFORMES			
Beija-flor	-	1	1

Tabela 3. Formação de frutos em *Amburana cearensis* (Fabaceae) após tratamentos de polinização manual, natural (controle) e exposição seletiva de polinizadores em área de Caatinga, Parnamirim, Pernambuco.

Tratamento	Flores - N	Frutos – N (%)
Agamospermia	13	0
Autopolinização		
Espontânea	18	0
Manual	13	0
Polinização cruzada		
Flores do mesmo indivíduo	15	0
Flores de indivíduos diferentes	21	0
Controle	1098	18 (1,6)
Visitantes Diurnos	30	1 (3,3)
Visitantes Noturnos	30	0

Tabela 4. Resultados da análise do crescimento dos tubos polínicos das flores submetidas à polinização cruzada, autopolinização manual e geitonogamia, após 12, 24 e 48 h de uma população de *Amburana cearensis* em área de Caatinga, Parnamirim, PE. Letras diferentes significam que os valores são diferentes estatisticamente de acordo com teste χ^2 ($p < 0,05$).

Tratamento	Pistilos (n) / Óvulos penetrados (n)		
	12 h	24 h	48 h
Autopolinização manual	-	-	15/ 3
Polinização cruzada			
Flores do mesmo indivíduo	15/ 6 ^a	14/ 7 ^a	15/ 10 ^b
Flores de indivíduos diferentes	15/ 5 ^a	15/ 9 ^a	-

Figuras



Figura 1. Flores de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae) em processo de abertura floral (A-B). A - início de antese no fim da tarde mostrando uma fenda por onde é visto o estigma e alguns estames; B – afrouxamento da pétala permitindo ver todos os verticilos reprodutivos; C - flor completamente aberta exibindo arqueamento da pétala para trás. Legenda: a - antera, p - pétala, s- estigma.



Figura 2. Variação de coloração encontrada em inflorescências e flores de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae) em uma área de Caatinga no município de Parnamirim, Pernambuco, Brasil, sendo possível observar indivíduos com verticilos florais de coloração branca (A) e indivíduos portando flores cor-de-rosa (B).

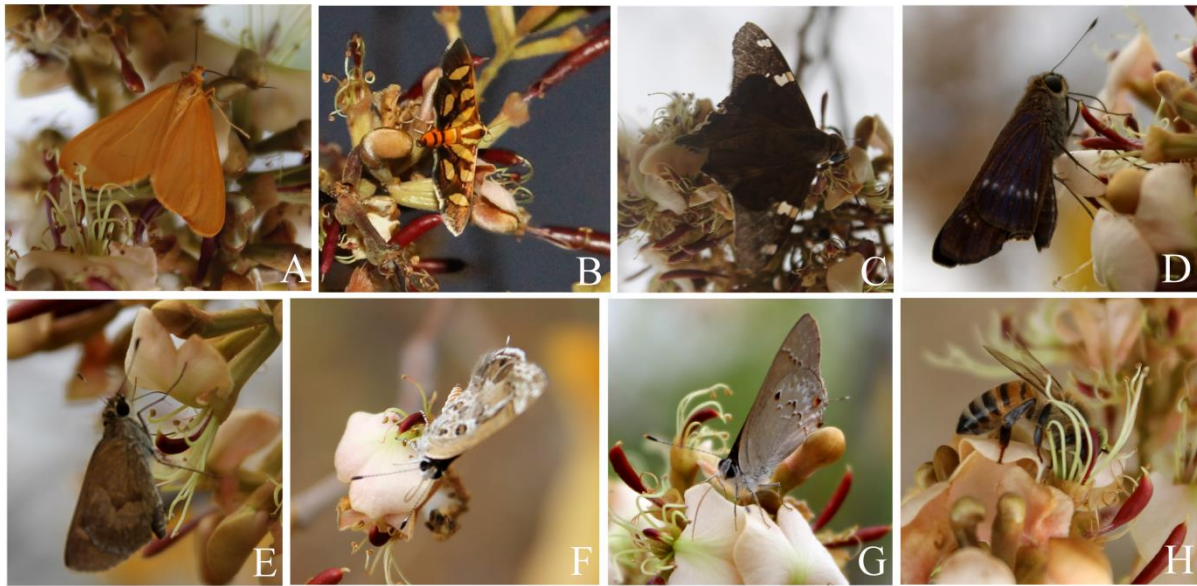


Figura 3. Polinizadores de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae) em uma área de Caatinga no município de Parnamirim, Pernambuco, Brasil, podendo-se observar os três grupos de visitantes, Mariposas (A-B), Borboletas (C-G) e Abelha (H).



Figura 4. Flores de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae) analisadas quanto a presença de osmóforos localizados na borda das pétalas (A) a partir da imersão em vermelho neutro, e testes de reflexão de luz ultravioleta (UV), a partir do reagente hidróxido de amônio (B) e observadas em uma câmara escura com luz UV (C). Legenda: o - osmóforos

4 PERFUMADA AO DIA E À NOITE: VOLÁTEIS FLORAIS EM *AMBURANA CEARENSIS* (FABACEAE) E SUA RELAÇÃO COM VISITANTES FLORAIS

Elivania Conceição Barral¹, Laís Angélica Borges², Oswaldo Cruz Neto¹, Ana Carolina Galindo Costa¹, Artur Campos Dália Maia^{3,4}, Isabel Cristina Machado⁵, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro⁶, Ariadna Valentina Lopes^{5,7}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, 58397-000, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil

⁴Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil.

⁵Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil.

⁶Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil

⁷Autor para correspondência: avflop@ufpe.br, ariadna.lopes@pq.cnpq.br

Resumo

O sucesso reprodutivo das angiospermas depende de um ajuste evolutivo dos polinizadores com os recursos e atrativos florais. O odor em especial pode ser considerado tanto um recurso como atrativo floral apresenta, geralmente, composição correspondente a preferência de visitantes florais. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi descrever os componentes do perfume floral de *Amburana cearensis* e discuti-los à luz da ecologia da polinização desta espécie ameaçada de extinção. Coletas de odor floral por meio do método *headspace* dinâmico, foram realizadas em área de ocorrência natural da espécie, no município de Parnamirim, PE, Brasil. A análise química do odor foi feita através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) com posterior identificação dos compostos a partir de literatura apropriada. O forte odor “floral branco” é caracterizado pela presença dominante de monoterpenos com destaque para linalol e óxidos de linalol e β -ocimeno, além do sesquiterpeno α -farneseno e álcool benzílico, um composto aromático. Verificou-se diferença na proporção relativa de compostos orgânicos voláteis emitido pelas flores de *A. cearensis* ao longo da antese, com destaque para um maior percentual de linalol em amostras obtidas durante o dia (Dia: 45,06% / Noite: 27,40%) e de seu óxido *cis*-furanoide à noite (Dia: 12, 24% / Noite: 29,52%). O odor floral de acordo com a frequência de visitas parece atrair principalmente mariposas não-esfingídeos e em menor frequência borboletas e algumas poucas espécies de abelhas. O buquê floral de *Amburana cearensis* parece estar relacionado com seu sistema de polinização, visto que há uma maior frequência de mariposas diurnas e noturnas sobre as flores, exibindo assim uma relação de preferência entre odor e mariposas sobre borboletas e abelhas.

Palavras-chave: *Amburana cearensis*; falenofilia; *headspace*; linalol; odor floral; polinização

Introdução

Recursos florais, como néctar, pólen e odor, estão diretamente envolvidos com as necessidades dos polinizadores e são sinalizados a estes através de atrativos florais. O odor, em especial, pode funcionar como recompensa floral (*e.g.* Dressler 1968; Carvalho & Webber 2000; Mitko *et al.* 2016; Nunes *et al.* 2016) ou como sinalizador potente de recursos florais a longas distâncias para os visitantes (Varassin & Amaral-Neto 2014). Os compostos orgânicos voláteis (COVs) florais atrativos aos polinizadores são emitidos por glândulas secretoras de cheiro altamente especializadas, como os osmóforos, que podem ocorrer em diferentes verticilos florais, como pétalas e sépalas ou nas recompensas florais, como pólen e néctar (Dobson & Bergström 2000; Raguso 2004; Dudareva & Pichersky 2006; Kessler & Baldwin 2006). As variadas composições químicas dos odores têm sido associadas às preferências de determinados grupos de polinizadores (*e.g.* Bestmann *et al.* 1997; Dobson 2006; Varassin & Amaral-Neto 2014).

O perfume floral parece ser o atrativo mais importante para visitantes noturnos e tem sido indicado como a principal característica responsável pela atração de visitantes em flores polinizadas por mariposas (Feagri & Pijl 1979; Endress 1994; Varassin & Amaral-Neto 2014). O sentido olfatório desses visitantes florais é frequentemente bem desenvolvido (Knudsen & Tollten 1993; Dötterl *et al.* 2006) e as flores polinizadas por estes animais emitem odores comumente descritos como agradáveis, fortes, penetrantes e adocicados (Baker 1961; Feagri & Pijl 1979; Knudsen & Tollten 1993; Raguso & Pichersky 1995).

Espécies de Leguminosae são polinizadas tanto por animais de hábitos diurnos como animais de hábito noturnos (*e.g.* Marinho *et al.* 2014), como mariposas, e apresentam osmóforos como principais estruturas secretoras de COVs florais. Em *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm., uma espécie ameaçada de extinção (Americas Regional Workshop 1998; IUCN 2016) e popularmente conhecida como amburana de cheiro, o odor floral é produzido em osmóforos localizados na pétala, a qual exala intenso odor adocicado durante todo o período de antese floral (obs. pessoal). As flores desta espécie apresentam características associadas a síndrome de polinização falenófila e são visitadas por mariposas e abelhas durante o dia e, exclusivamente, por mariposas noturnas durante a noite (Barral *et al.*, em prep.; Capítulo 1 desta tese).

Ritmos circadianos na produção de odores florais tem sido registrados, podendo ocorrer diferenças na quantidade e/ou qualidade do odor ao longo do dia, havendo relação ao pico de atividade de determinado tipo de polinizador dominante com picos de produção de odor ou

COV dominante (Matile & Altenburger 1988; Hoballah *et al.* 2005; Waelti *et al.* 2008; Fenske & Imaizumi 2016). A investigação dos períodos de produção de determinados COVs no período de antese floral oferece informações mais detalhadas no que se refere à participação de diferentes vetores de pólen em espécies que exalam odor durante toda antese. Levando em consideração o período de antese de um dia das flores de *A. cearensis* e a grande variedade de visitantes florais ao longo desse período, o objetivo deste estudo foi descrever os componentes do perfume floral de *Amburana cearensis* e discuti-los à luz da biologia da polinização para responder as seguintes questões: (1) quais os principais COVs presentes no buquê floral desta leguminosa ameaçada de extinção? (2) há síntese de diferentes compostos pelas flores durante o dia e a noite? e (3) baseado em dados disponíveis na literatura, existe correlação entre os referidos COVs e o sistema de polinização da espécie?

Neste estudo, procuramos entender a dinâmica de emissão de odor de *A. cearensis* e sua função na atração dos visitantes florais. Esta espécie está ameaçada de extinção e depende de animais polinizadores para sua reprodução, sendo, portanto, o odor uma característica essencial compreendermos sua biologia reprodutiva.

Material e Métodos

Local de coleta e espécie estudada

O estudo foi conduzido em um local de ocorrência natural da espécie, em área de Caatinga, um tipo de floresta seca brasileira, em Parnamirim (39° 31' O 8° 6' S), Pernambuco, nordeste do Brasil. A vegetação é predominantemente composta por Caatinga Hiperxerófila com trechos de Floresta Caducifólia, e situa-se na unidade geoambiental da Depressão Sertaneja (CPRM 2005). O clima é do tipo Tropical Semi-Árido, com chuvas de verão entre novembro a abril e precipitação média anual de 431,8 mm (CPRM – Serviço Geológico do Brasil 2005).

Amburana cearensis (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae), é uma leguminosa arborea típica de Caatinga com importância socioeconômica e ecológica (*e.g.* Kiill 2010; Catão *et al.* 2011; Bitu *et al.* 2015) que se encontra ameaçada de extinção (Americas Regional Workshop 1998; IUCN 2016). Sua floração ocorre entre os meses de maio a junho, correspondendo à estação seca na área de estudo e se estende por aproximadamente um mês (obs. pessoal). As flores estão dispostas em inflorescências congestas (Barral *et al.*, em prep.; Capítulo 1 desta tese) apresentam coloração branca, néctar como recurso floral, antese crepuscular e odor intenso e adocicado, sendo possível enquadrá-las na síndrome de polinização falenofilia *sensu* Feagri &

Pijl (1979) (Barral *et al.* em prep.; Capítulo 1 desta tese). Como visitantes florais, foram registrados principalmente espécies de mariposas diurnas e noturnas e abelhas, e, com menor frequência, espécies de dípteros e coleópteros (Barral *et al.* em prep.; Capítulo 1 desta tese).

Coleta e análise dos voláteis florais

A identificação da composição química dos odores florais de *A. cearensis* foi realizada pela técnica de extração por “headspace” dinâmico (ver Dötterl & Jurgens 2005). Amostras *in situ* dos voláteis emitidos por inflorescências com flores em antese e de amostras controle. Uma inflorescência inteira foi usada por amostra devido não ser possível isolar uma única flor de botões e flores senescentes. Para o tratamento controle foram usados ramos vegetativos, folhas e caule, incluindo ar ambiente.

Foram coletadas 14 amostras das inflorescências e duas amostras controle. Oito amostras diurnas e uma amostra controle foram coletadas no período da manhã (entre 06:00 – 10:00 h) e da tarde (entre 14:00 – 16:00 h). Seis amostras noturnas e um controle foram realizadas no início da noite (entre 18:00 – 22:00 h) e da madrugada (entre 00:00 – 02:00 h).

Para realizar a coleta, inflorescências com botões florais em pré-antese foram previamente ensacadas com sacos de *voil* para evitar contaminação por qualquer visitante floral ou florívoro. No momento da coleta das amostras das inflorescências, o saco *voil* foi retirado e as inflorescências e o material vegetativo (ramos sem inflorescência, com folhas em fase de senescência) foram ensacados em sacos de polietileno associada a uma coluna de vidro com carvão ativado para entrada de ar filtrado.

Os voláteis emitidos retidos dentro do saco foram capturados por cerca de duas horas por amostra em tubos de vidro contendo 50 mg de uma mistura 1:1 dos polímeros adsorventes Tenax™ TA (80/100 mesh, Supelco, EUA) e Carboxen™ X (20/40 mesh, Supelco, EUA), através de uma bomba de vácuo (G12/01 EB, Rietschle Thomas, Puchheim, Alemanha). Após a coleta, os tubos de vidro com os voláteis florais retidos foram lavados eluídos com hexano (250 µL; grau de pureza 99,9%, Sigma–Aldrich, EUA) e armazenados em vials de 2 mL sob refrigeração -24 °C até análise.

As amostras coletadas foram analisadas através de cromatografia gasosa – espectrometria de massa (CG-EM) em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series GC/MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm espessura da película). Para cada amostra, uma alíquota de 1,0 µL foi injetada em modo split, que variou entre 1:10 – 1:30 de acordo com a concentração da amostra. A temperatura do GC foi ajustada em 40 °C por 2 min, então

aumentada em 4 °C min⁻¹ até 230 °C e mantida por 5 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 7,0 psi. A interface do EM foi definida em 230 °C e os espectros de massa registrados em 70eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan^{-s} de *m/z* 40-350. Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas de cada composto. Foram calculados os índices de retenção de Kovats (Schomburg, 1990) de modo a fornecer um meio para comparação com dados disponíveis na literatura. Compostos não identificados que perfizeram valor percentual inferior a 1% em cada amostra foram somados e apresentados de acordo com a classe química a quais pertencem.

Emissão de odor e visitantes florais

Foram analisados os principais COVs presentes no buquê floral de *A. cearensis* no período noturno e diurno e suas quantidades médias relativas emitidas ao longo da antese. Para verificar possíveis diferenças entre os compostos emitidos durante o dia e à noite foram realizadas análises estatísticas paramétricas (Teste t) e quando necessário não-paramétricas (Teste de Mann-Whitney). Pré-requisitos para execução dos testes paramétricos foram atendidos com normalidade (Lilliefors) e homogeneidade de variância dos dados, além disso, valores de “p” foram determinados com base em um alfa bilateral de 5% de significância. Os testes estatísticos foram conduzidos com auxílio do programa BioEstat v. 5.3.

Além disso, as possíveis diferenças entre os voláteis emitidos nos dois horários da antese foram analisadas a partir do cálculo do índice de dissimilaridade de Bray Curtis e, baseado nessa matriz, foi realizada uma análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS). Foi também realizada uma Análise de Principais Componentes (PCA) para identificar os principais COVs que permitiram identificar uma possível diferença entre os horários. Vale ressaltar que estas análises foram realizadas apenas para os voláteis que perfizeram 1% do percentual relativo de emissão em pelo menos uma das amostras coletadas. Estas análises foram conduzidas com auxílio do programa Past 3.

Os compostos emitidos no odor floral sob uma visão qualitativa e quantitativa foram comparados e discutidos quanto aos grupos de animais polinizadores diurnos e noturnos de *A. cearensis* encontrados em Barral *et al.* (em prep.; Capítulo 1 desta tese).

Resultados

Durante o período de antese as inflorescências exalaram um aroma agradável, forte e adocicado, perceptível a cerca de 30 m da planta pelo olfato humano, sendo mais intenso à noite. Cerca de 50 diferentes compostos foram identificados no buquê de odor floral de *A. cearensis*, dos quais, 16 não puderam ser identificados. A composição química do perfume floral de *A. cearensis* é apresentada na Tabela 1 e os compostos estão organizados em classes de acordo com a sua origem biossintética e subclasses conforme sua função (*sensu* Knudsen *et al.* 2006).

Cinco categorias de compostos químicos foram detectadas: (1) alifáticos, (2) benzenóides e fenilpropanóides, (3) compostos de cadeia C5 ramificada, (4) compostos cíclicos diversos e (5) terpenos, subdivididos em monoterpenos, sesquiterpenos e terpenos irregulares (Tabela 1). O odor floral foi dominado por terpenos, principalmente linalol, e por álcool benzílico, compostos mais abundantes em toda amostragem independente do horário de coleta do odor (Tabela 2). A distribuição dessas categorias no buquê floral e seus principais componentes químicos em amostras diurnas e noturnas estão na Tabela 2. Entre os terpenos voláteis as duas subclasses foram bem representativas: (1) monoterpenos, com destaque para linalol, óxidos de linalol e (*E*)- β -ocimeno; e (2) sesquiterpenos, notadamente (*E,E*)- α -farneseno.

As quantidades de COVs emitidos entre os períodos diurno e noturno não diferiram de forma significativa ($t = -0,508$, $gl = 77$, $p = 0,1259$). Contudo, verificou-se diferença qualitativa nos buquês florais. Essa diferença ocorreu pela presença exclusiva de oito compostos químicos durante o dia (*Monoterpenos* – (3*E*,5*E*)-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno e um composto não indentificados; *Sesquiterpenos* – α -Copaeno, (2*Z*,6*E*)-Farnesol; *Não identificados* - quatro compostos não identificadas) e quatro compostos exclusivos do período noturno (*Alifáticos* – (*Z*)-3-Hexenol, 2-Etilhexanol; *C5-cadeia ramificada* – 2-Metilbutanol, *Não identificados* – um composto não indentificado).

Os voláteis dominantes das flores de *A. cearensis* (Linalol, Óxido de *cis*-linalol furanóide, (*E,E*)- α -Farneseno, Óxido de *cis*-linalol (piranóide), Álcool benzílico, (*E*)- β -Ocimeno e Óxido de *trans*-linalol (piranóide)) foram emitidos por todo período da antese, porém as proporções de emissão dos COVs mais abundantes, linalol e óxido linalol *cis* variaram durante a antese (Figura 1). O linalol foi encontrado em maior proporção durante o dia ($t = 3,87$, $gl = 12$, $p = 0,0022$), com pico entre 06:00-09:00 h e o óxido linalol *cis* (furanóide) esteve em maior quantidade no período noturno, com pico entre 18:00-22:00 h ($t =$

-6,35, gl= 12, $p < 0,0001$) e (Tabela 2) (Figura 1 e 2). Os demais voláteis não diferiram quanto a produção entre o dia e a noite. Todos os voláteis apresentaram uma queda na emissão no período da tarde entre 14:00-16:00 h.

Embora a quantidade de odor emitida durante a noite e o dia tenha sido similar há um pico de produção diurna. A produção de odor começa no início da antese e se mantém constante até o início da madrugada. Por volta das 02:00 h há um aumento gradual da quantidade de voláteis florais emitidos, atingindo pico por volta das 09:00 h, com quantidade de emissão de voláteis de cerca de duas vezes a produção inicial (Figura 1).

Discussão

O odor de *Amburana cearensis*, de uma forma geral, está de acordo com a “imagem branca floral olfatória” descrita por Kaiser (1991, 1993), uma fragrância universal para plantas com flores brancas, de antese noturna, polinizadas por mariposas (Raguso & Pichersky 1999). O buquê floral dominado por terpenos, com destaque para o linalol, seu óxido *cis*-furanóide e (E,E)- α -farneseno, caracteriza esta “imagem branca floral olfatória”, que de acordo com Dobson (2006) é caracterizada pela dominância de terpenóides, sendo o linalol mais comum seguido de *trans*- β -ocimeno, β -cariofileno, e farneseno. Portanto, em reforço a essa proposta de “imagem” de odor, à exceção do β -cariofileno, todos esses componentes estavam presentes do perfume floral de *A. cearensis*. Em adição ao odor, a pétala apresenta coloração pálida, típica de espécies falenófilas (*sensu* Feagri Pijl 1979) e o uso combinado desses atrativos, visual e olfativo, tende a favorecer a constância floral dos polinizadores, visto que abelhas e mariposas percebem odores e cores como estímulos atrativos de formas distintas (Varassin & Amaral-Neto 2014).

Os COVs florais de *A. cearensis* podem ser considerados semelhantes ao de outras espécies polinizadas por mariposas (Baker 1961; Feagri & Pijl 1979; Knudsen & Tollten 1993; Pichersky *et al.* 1994; Raguso & Pichersky 1995; Waelti *et al.* 2000; Plepys *et al.* 2002^a; Riffell *et al.* 2008) devido a dominância de compostos benzenóides e terpenos, principalmente linalol, óxidos de linalol, β -ocimeno e α -farneseno.

Além do álcool benzílico, linalol e β -ocimeno figuram entre os voláteis mais comumente encontrados em perfumes florais, ocorrendo em 70% e 71% das plantas com sementes respectivamente (*sensu* Knudsen *et al.* 2006). Ambos são componentes químicos encontrados no perfume floral de espécies polinizadas por lepidópteros, incluindo borboletas e mariposas (Andersson *et al.* 2002; Dobson 2006). Linalol, o mais abundante componente

(dia: 32,81 – 54,88 %; noite: 19,37 – 41,04 %) do buquê do odor floral de *A. cearensis*, é um monoterpeneo que possui odor doce e agradável (Raguso & Pichersky 1999; Blank *et al.* 2007) e dominante em espécies polinizadas por mariposas (Knudsen & Tollsten 1993; Raguso & Pichersky 1995; Majetic *et al.* 2015). Entretanto, este COV pode ser encontrado amplamente em flores de antese diurna (Raguso & Pichersky 1999) polinizadas por abelhas (Borg-Karlson *et al.* 1996; Parachnowitsch *et al.* 2012, 2013; Gong *et al.* 2015), borboletas (Honda *et al.* 1998; Chen *et al.* 2012) e besouros (Thien *et al.* 1975; Steenhuisen *et al.* 2010, 2012). Há, ainda, registro do linalol como atrativo para moscas (El-Sayed, 2018).

O álcool benzílico, o benzenóide mais abundante em *A. cearensis*, ocorre em 56% das famílias de plantas com sementes (Knudsen *et al.* 2006) e possui odor fraco levemente adocicado (Bauer 2001). Este composto está presente em altas quantidades em flores polinizadas por borboletas (Dobson 2006), como em *Ligustrum japonicum* (Oleaceae) (Honda *et al.* 1998) e foi associado na atração de florívoros, como coleópteros Mordellidae em flores de *Cirsium arvense* (Asteraceae) (Theis 2006). As flores de *A. cearensis* são visitadas por espécies de borboletas polinizadoras, mas também foram observados coleópteros florívoros (ver Barral *et al.* dados não publicados), sugerindo uma possível relação entre álcool benzílico e a herbivoria nas flores desta espécie.

O sesquiterpeno α -farneceno, o terceiro (ca. 17%) mais frequente volátil do buquê floral de *A. cearensis*, também pode compor perfumes florais de espécies não polinizadas por mariposas, como a pisticófila *Buddleja davidii* (Scrophulariaceae) (Tholl & Röse 2006). A combinação e a relação de dominância entre os três voláteis mais frequentes no odor floral de *A. cearensis* também foi observada em *Lonicera* (Caprifoliaceae) (Joulain 1986, *apud* Dobson 2006), espécie polinizada por ambos os grupos de mariposas, esfingídeos e noctuídeos. Este composto também é conhecido como atrativo para besouros, moscas e abelhas Euglossine (El-Sayed, 2018).

Os compostos alifáticos (Z)-3-hexenol e 2-etillhexanol, também conhecidos como “green leaf volatiles” ou GLVs, foram exclusivos do odor produzido à noite. Tais compostos, constituem um grande grupo de voláteis herbívoro-induzido associados a função de defesa da planta (Allmann *et al.* 2013), podendo atrair predadores ou parasitoides de insetos herbívoros como vespas e geralmente são produzidos em maior quantidade após danos aos tecidos vegetais (Kessler & Baldwin 2001; Brodmann *et al.* 2008; Allmann & Baldwin 2010). A presença destes voláteis no perfume de *A. cearensis* pode estar envolvida na atração das vespas que visitam flores e botões florais desta espécie à procura de larvas deixadas provavelmente por lepidópteros (Barral *et al.*, dados não publicados). Contudo, o fato dos

GLVs serem encontrados amplamente na natureza não faz com que estejam necessariamente envolvidos na acurada localização das flores (Honda *et al.* 1998), sendo melhor interpretados como sinais não-específicos de danos na planta (Hoballah *et al.* 2002).

Ritmos circadianos na emissão de odor, como verificado em *A. cearensis*, são observados em espécies de antese noturna (Fenske & Imaizumi 2016; Dötterl *et al.* 2005; Morinaga *et al.* 2009; Kong *et al.* 2012; Yokota & Yahara 2012), contudo tanto a periodicidade da fragrância, como o fechamento floral diurno parecem ter evoluído como modificações secundárias nas flores polinizadas por mariposas (Raguso & Pichersky 1995). *Amburana cearensis* não apresenta modificações secundárias como fechamento e emissão de odor exclusivamente noturno, podendo atrair abelhas, moscas, borboletas e beija-flores durante o dia (ver Barral *et al.* em prep; capítulo 1), contudo as mariposas noturnas e diurnas são os visitantes e polinizadores mais frequentes, sendo um indicativo de que o odor pode promover uma resposta sensorial mais forte nas mariposas (ver Barral *et al.* em prep; capítulo 1 desta tese).

A mudança qualitativa na emissão dos voláteis florais diurno, como na produção do linalol, pode ser associada à atração das mariposas. O aumento na quantidade relativa de linalol emitida é acompanhada por um aumento na frequência de mariposas, com um primeiro pico de frequência entre 05:00-06:00 h e um segundo pico entre 08:00-09:00 h, este último horário correspondendo ao máximo de linalol produzido no odor floral. A produção rítmica de linalol pode ser observada em outras espécies de antese noturna (Matile & Altenburger 1988; Loughrin *et al.* 1991; Miyake *et al.* 1998; Raguso *et al.* 2003) e a variação desse volátil sob forte seleção, como S - (+) - linalol, sugere regulação com possíveis funções ecológicas (Reisenman *et al.* 2010; Burdon *et al.* 2015). Linalol é amplamente encontrado em espécies de planta com sementes e atrativo para um amplo espectro de polinizadores (Raguso & Pichersky 1999, Raguso 2016), logo parece estar direta e positivamente correlacionada a atração de mariposas diurnas e outros visitantes florais diurnos como as abelhas e borboletas na espécie estudada. Meagher & Landolt (2008) verificaram que a combinação de diferentes compostos orgânicos voláteis com o odor floral chave phenylacetaldehyde (PAA) resultaram em diferentes respostas, que variam entre as espécies atraídas capturadas. Desta forma, a combinação de diferentes compostos orgânicos florais emitidos durante o dia e a noite combinados ao linalol pode permitir o amplo espectro de visitantes florais de *A. cearensis*.

No máximo de produção de linalol, o monoterpene β -ocimeno apresenta um pico de produção que marca sua maior proporção no buquê do odor floral diurno. Este volátil é o componente considerado atrativo para abelhas, moscas e borboletas (Raguso & Pichersky

1995), tendo mostrado fortes resposta eletrofisiológicas em antenas da borboleta *Heliconius melpomene* (Nymphalidae: Heliconiinae) (Andersson & Dobson 2003). O β -ocimeno, portanto, pode estar ativamente contribuindo para a maior ocorrência dos visitantes florais diurnos não-mariposas, as borboletas e abelhas, que são mais frequentes no intervalo entre 07:00-16:00 h (Figura 1). As abelhas, apesar de efetivas, foram, contudo, visitantes raros, totalizando apenas 6% da frequência de visitas em *A. cearensis* (Barral *et al.*, em prep.; Capítulo 1 desta tese). Odores florais de espécies polinizadas por abelhas, apesar de serem muito variáveis e frequentemente dominados por monoterpenos (Dobson 2006), como trans- β -ocimeno para *Vicia* (Fabaceae) (Sutton *et al.* 1992), não parecem ter fortes respostas na atração desses animais às flores de *A. cearensis* na área estudada. Possivelmente, a falta de um guia visual mais atrativo e um recurso floral mais compensatório, como néctar mais concentrado, (ca. $23\% \pm 10,60$ em *A. cearensis*, ver Barral *et al.* em prep; capítulo 1 desta tese), pode estar envolvido na menor frequência das abelhas, visto que tais atributos são determinantes no forrageio desses animais.

Em resumo, as flores de *A. cearensis* apresentam odor floral forte e adocicado conferida pela dominância de monoterpenos, em especial linalol, sendo, possivelmente, responsável pela atração de mariposas noturnas e diurnas como principais vetores de polinização. A presença de outros terpenóides em adição ao linalol, contudo provavelmente contribui para atração de outros visitantes florais diurnos com comportamento adequado a polinização, que em experimento de polinização seletiva realizado por Barral *et al.* (em prep; capítulo 1) se mostraram mais efetivos que polinizadores noturnos. Além disso, a contínua produção de odor ao longo de toda antese em adição a mudança qualitativa no perfume floral com pico de produção de linalol durante o dia, amplia o espectro de polinizadores efetivos de *A. cearensis*, que podem, portanto, aumentar o sucesso reprodutivo da espécie que apresenta grande importância socioeconômica e está ameaçada de extinção.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brasil) pela bolsa concedida a E.C. Barral, a Eurico Lustosa e equipe da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim (EAIP) – UFRPE, Brasil pela estrutura e apoio no trabalho de campo.

Referências

- Allmann, S. & Baldwin, I.T. 2010. Insects betray themselves in nature to predators by rapid isomerization of green leaf volatiles. *Science* 329:1075–8.
- Allmann S., Späthe, A., Bisch-Knaden, S., Kallenbach, M., Reinecke, A., Sachse, S., Baldwin, I.T. & Hansson, B.S. 2013. Feeding-induced rearrangement of green leaf volatiles reduces moth oviposition. *eLife* 2:e00421.
- Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica). 1998. *Amburana cearensis*. In: IUCN 2007 Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 March 2008.
- Amorim, F.W., Galetto, L. & Sazima, M. 2013. Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology* 15: 317–327.
- Andersson, S. & Dobson, H.E.M. 2003. Antennal responses to floral scents in the butterfly *Heliconius melpomene*. *Journal of Chemical Ecology* 29(10): 2319-2330.
- Andersson, S., Nilsson, L.A., Groth, I. & Bergström, G. 2002. Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 129–153.
- Baker, H. 1961. The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *Quart. Rev. Biol.* 36: 64-73.
- Bauer, K., Garbe, D. & Surburg, H. 2001. *Common Fragrance and Flavor Materials*. Wiley-VCH, Weinheim, 2001. Pag. 93
- Bestmann, H.J., Winkler, L.
- BioEstat v.5.3. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. Disponível em <http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53/k>
- Bitu, V.C.N., Bitu, V.C.N., Matias, E.F.F., Lima, W.P., Portelo, A.C., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A. 2015. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public Markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 172: 265–272.
- Breed, M.F., Ottewell, K.M., Gardner, M.G., Marklund, M.H.K., Dormontt, E.E. & Lowe, A.J. 2015. Mating patterns and pollinator mobility are critical traits in forest fragmentation genetics. *Heredity* 115: 108–114.
- Blank, A.F. et al. 2007. Maria Bonita: cultivar de manjerição tipo linalol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 12, p. 1811-1813, dez. 2007. Disponível em:

- <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2007001200020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 nov. 2015.
- Brodmann, J., Twele, R., Francke, W., Hölzler, G., Zhang, Q-H. & Ayasse, M. 2008. Orchids mimic green-leaf volatiles to attract prey-hunting wasps for pollination. *Current Biology* 18: 740–744.
- Burdon, R.C.F., Raguso, R.A., Kessler, A. & Parachnowitsch, A.L. 2015. Spatiotemporal floral scent variation of *Penstemon digitalis*. *J Chem Ecol* 41:641–650.
- Carvalho R. & Webber, A.C. 2000. Biologia floral de *Unonopsis guatteriioides* (A. D.C.) R.E. Fr., uma Annonaceae polinizada por Euglossini. *Revista brasileira de Botânica* 23(4): 421–42.
- Catão, C. G., Paes, J. B., Gomes, J. P. & Araújo, G. T. 2011. Qualidade da madeira de cinco espécies florestais para o envelhecimento da cachaça. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 15(7): 741–747.
- Chen, G., Gong, W.C., Ge, J., Dunn, B.L. & Sun, W.B. 2012. Floral scents of typical *Buddleja* species with different pollination syndromes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44: 173–178.
- CPRM – Serviço Geológico do Brasil 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Parnamirim, estado de Pernambuco. Org(s) J.C. Mascarenhas, B.A. Beltrão, L.C. Souza Junior, M.J. T. G. Galvão, S.N. Pereira, J. L. F. Miranda. Recife: CPRM/PRODEEM, 2005.
- Cruz-Neto, O., Lopes, A.V.F. & Machado, I.C. 2007. Ecologia da Polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae-Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 5(1): 570-572.
- Dobson, H.E.M. 1991. Analysis of flower and pollen volatiles. In: *Modern Methods of Plant Analysis*, New Series, Vol. 12 (H. F. Linskens & J. F. Jackson, Eds.), pp. 231–251. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Dobson, H.E.M. 2006. Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: *Biology of Floral Scent*, Dudareva, N. & Pichersky, E. Eds. Editora Taylor & Francis, Boca Raton.
- Dobson, H.E.M. & Bergström, G. 2000. The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematic and Evolution* 222: 63-87.
- Dötterl, S., Burkhardt, D., Weißbecker, B., Jürgens, A., Schütz, S. & Mosandl, A. 2006 a. Linalool and lilac aldehyde/alcohol in flower scents electrophysiological detection of lilac aldehyde stereoisomers by a moth. *Journal of Chromatography A*, 1113: 231–238.

- Dötterl, S., Jürgens, A., Seifert, K., Laube, T., Weißbecker, B., Schütz, S. 2006 b. Nursery pollination by a moth in *Silene latifolia*: the role of odours in eliciting antennal and behavioural responses. *New Phytologist* 169: 707-718.
- Dötterl, S., Wolfe, L.M., Jürgens, A. 2005. Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. *Phytochemistry* 66: 203–213.
- Dressler, R.L. 1968. Pollination by Euglossine bees evolution. *Evolution* 22(1): 202-210.
- Dudareva, N. & Pichersky, E. 2006. Floral Scent Metabolic Pathways: Their Regulation and Evolution. In: *Biology of Floral Scent*, Dudareva, N. & Pichersky, E. Eds. Editora Taylor & Francis, Boca Raton.
- El-Sayed AM 2018. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <<http://www.pherobase.com>>
- Endress, P.K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge. Cambridge University Press.
- Faegri, K. & Pijl, L. van der. 1979. *The principles of pollination ecology*. Oxford. Pergamon Press.
- Fenske, M.P. & Imaizumi, T. 2016. Circadian rhythms in floral scent emission. *Frontiers in Plant Science* 7: 462.
- Gong, W.-C., Chen, G., Vereecken, N.J., Dunn, B.L., Ma1, Y.-P. & Sun, W.-B. 2015. Floral scent composition predicts bee pollination system in five butterfly bush (*Buddleja*, Scrophulariaceae) species. *Plant Biology* 17: 245–255.
- Hoballah, M.E.F, Tamo, C. & Turlings, T.C.J. 2002. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: Is quality or quantity important? *J Chem Ecol* 28:951–68.
- Honda, K., Ômura, H. & Hayashi, N. 1998. Identification of floral volatiles from *Ligustrum japonicum* that stimulate flower-visiting by cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* 24: 2167–2180.
- IUCN The Red List of Threatened Species. Version 2016-2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 19 September 2016.
- Joulain, D. 1986. Study of the fragrance given off by certain springtime flowers. In: *Progress in Essential Oil Research*, Brunke, E.-J., Ed., Walter de Gruyter, Berlin, p. 57.
- Kaiser, R. 1991. Trapping, investigation and reconstitution of floral scent. In: *Perfume: Art, Science and Technology* (eds P. Müller & D. Lamparsky) pp. 213-248. Elsevier Publications Inc., New York.

- Kaiser, R. 1993. *The scent of orchids: olfactory and chemical investigations*. Elsevier Ltd, Amsterdam.
- Kessler, A. & Baldwin, I.T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291:2141–4.
- Kessler, D. & Baldwin, I.T. 2006. Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* 49: 840–854.
- Kiill, L.H.P. 2010. Plantas da Caatinga ameaçadas de extinção e sua associação com polinizadores. In: *Semana dos Polinizadores, 2*. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010.
- Kiill, L.H.P. & Lima, P.C.F. 2011. Plano de manejo para espécies da caatinga ameaçadas extinção na reserva legal do projeto salitre. Petrolina. Embrapa Semiárido.
- Kong, Y., Sun, M., Pan, H-T. & Zhang, Q-X. 2012. Composition and emission rhythm of floral scent volatiles from eight lily cut flowers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 137(6): 376–382.
- Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J. & Ståhl, B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review* 72(1): 1–120.
- Knudsen J.T. & Tollsten L. 1993. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: Floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society* 113: 263-284.
- Loughrin, J.H., Hamilton-Kemp, T.R., Andersen, R.A. & Hildebrand D.F. 1991. Circadian rhythm of volatile emission from flowers of *Nicotiana sylvestris* and *N. suaveolens*. *Physiologia Plantarum* 83: 492-496,
- Majetic, C.J., Wiggam, S.D., Ferguson, C.J. & Raguso, R.A. 2015. Timing is Everything: Temporal variation in floral scent, and its connections to pollinator behavior and female reproductive success in *Phlox divaricata*. *The American Midland Naturalist*, 173(2):191-207.
- Marinho, C.R., Souza, C.D., Barros, T.C. & Teixeira S.P. 2014. Scent glands in legume flowers. *Plant Biology*. 16: 215–226.
- Matile, P. & Altenburger, R. 1988. Rhythms of fragrance emission in flowers. *Planta* 174: 242-247.
- Meagher, R.L. & Landolt, P.J. 2008. Attractiveness of binary blends of floral odorant compounds to moths in Florida, USA. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128: 323–329

- Mitko, L., Weber, M.G., Ramirez, S.R., Hedenström, E., Wcislo, W.T. & Eltz, T. 2016. Olfactory specialization for perfume collection in male orchid bees. *Journal of Experimental Biology* 219: 1467-1475.
- Miyake, T., Yamaoka, R. & Yahara, T. 1998. Floral scents of hawkmoth-pollinated flowers in Japan. *Journal of Plant Research* 111: 199-205.
- Morinaga, S-I., Kumano, Y., Ota A, Yamaoka, R. & Sakai, S. 2009. Day–night fluctuations in floral scent and their effects on reproductive success in *Lilium auratum*. *Popul Ecol* 51:187–195.
- Nunes, C.E.P., Peñaflor, M.F.G.V., Bento, J.M.S., Salvador, M.J. & Sazima, M. 2016. The dilemma of being a fragrant flower: the major floral volatile attracts pollinators and florivores in the euglossine-pollinated orchid *Dichaea pendula*. *Oecologia* 182: 933–946.
- Oliveira, R., Duarte Junior, J.A., Rech, A.R. & Avila Jr. R.S. 2014. Polinização por lepidópteros. In: *Biologia da polinização*, Rech A.R., Agostini, K., Oliveira, P.E., & Machado, I.C. Orgs. Editora Projeto Cultural, Rio de Janeiro.
- Parachnowitsch, A.L., Raguso, R.A. & Kessler, A. 2012. Phenotypic selection to increase floral emission, but not flower size or colour in bee-pollinated *Penstemon digitalis*. *New Phytol.* 195: 667–675.
- Parachnowitsch, A.L., Burdon, R.C.F., Raguso, R.A. & Kessler, A. 2013. Natural selection on floral volatile production in *Penstemon digitalis*: Highlighting the role of linalool. *Plant Signaling & Behavior* 8:1 e22704-137.
- Pichersky, E., Raguso, R.A., Lewinsohn, E. & Croteau, R. 1994. Floral scent production in *Clarkia* (Onagraceae). I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity. *Plant Physiol.* 106: 1533-1540.
- Plepys, D., Ibarra, F. & Löfstedt, C. 2002. Volatiles from flowers of *Platanthera bifolia* (Orchidaceae) attractive to the silver Y moth, *Autographa gamma* (Lepidoptera:Noctuidae). *Oikos* 99: 69–74.
- Raguso, R.A. 2004. Why are some floral nectars scented? *Ecology*, 85(6): 1486–1494.
- Raguso, R.A. 2016. More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. *Current Opinion in Plant Biology* 32: 31–36.
- Raguso R.A. & Pichersky E. 1995. Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): Recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Systematics and Evolution* 194: 55-67.

- Raguso, R.A. & Pichersky, E. 1999. A day in the life of a linalool molecule: chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biol.* 14:95-120.
- Raguso, R.A., Levin, R.A., Foose, S.E., Holmberg, M.W. & McDade, L.A. 2003. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* 63: 265–284.
- Rech A.R., Avila Jr., R.S. Schlindwein, C. 2014. Síndromes de polinização: especializações e generalizações. In: *Biologia da polinização*, Rech A.R., Agostini, K., Oliveira, P.E., & Machado, I.C. Orgs. Editora Projeto Cultural, Rio de Janeiro.
- Riffell, J.A, Alarco, R., Abrell, L., Davidowitz, G., Bronstein, J.L. & Hildebrand, J.G. 2008. Behavioral consequences of innate preferences and olfactory learning in hawkmoth–flower interactions. *PNAS* 105(9): 3404–3409.
- Schomburg, G. 1990. *Gas Chromatography: A Practical Course*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- Seleme, E.P., Lewis, G.P., Stirton, C.H., Sartori, A.L.B. & Mansano, V.F. 2015. A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa* 212 (4): 249–263.
- Steenhuisen, S.L., Raguso, R.A., Jürgens, A., Johnson, S.D., 2010. Variation in scent emission among floral parts and inflorescence developmental stages in beetle pollinated *Protea species* (Proteaceae). *S. Afr. J. Bot.* 76: 779–787.
- Steenhuisen, S.-L., Raguso, R.A. & Johnson, S.D. 2012. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea species* (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. *Phytochemistry* 84: 78–87.
- Sutton, C.J., Keegans, S.J., Kirk, W.D.J. & Morgan, E.D. 1992. Floral volatiles of *Vicia faba*. *Phytochemistry* 31(10): 3427-3428.
- Theis, N. 2006. Fragrance of Canada thistle (*Cirsium arvense*) attracts both floral herbivores and pollinators. *J Chem Ecol* 32:917–927.
- Thien L., Heimermann W.H. & Holman R.T. 1975. Floral odors and quantitative taxonomy of *Magnolia* and *Liriodendron*. *Taxon* 24: 557-568.
- Tholl, D. & Röse, U.S.R. 2006. Detection and Identification of Floral Scent Compounds. In: *Biology of Floral Scent*, Dudareva, N. & Pichersky, E. Eds. Editora Taylor & Francis, Boca Raton.

- Varassin, I.G. & Amaral-Neto, L.P. 2014. Atrativos. In: *Biologia da polinização*, Rech A.R., Agostini, K., Oliveira, P.E., & Machado, I.C. Orgs. Editora Projeto Cultural, Rio de Janeiro.
- Vogel, S. 1963. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung. Über Bau und Funktion der Osmophoren. Akad. Wiss. Lit. Abh. Math.-Natur. Kl. 10: 601–763.
- Willmer P. 2011. *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press, New Jersey.
- Yokota, S. & T. Yahara. 2012. Pollination biology of *Lilium japonicum* var. *abeanum* and var. *japonicum*: Evidence of adaptation to the different availability of diurnal and nocturnal pollinators. Plant Species Biology 27:96–105.

Lista de tabelas

Tabela 1. Amplitude e média da quantidade relativa (%) dos componentes do perfume floral de *Amburana cearensis* (Fabaceae) identificados em amostras de headspace dinâmico. IR = Índice de retenção de Kovàts.

	IR	Dia (n=8)	Noite (n=6)
Alifáticos			
<i>Álcoois</i>			
(Z)-3-Hexenol	854	---	0,15 ^a
2-Etilhexanol	1029	---	0,08 ^a
Benzenoides e fenilpropanoides			
<i>Aldeídos</i>			
Benzaldeído	960	0,01 – 0,09 (0,05)	0,08 – 0,34 (0,17)
<i>Álcoois</i>			
Álcool benzílico	1033	0,29 – 16,82 (7,57)	3,78 – 13,05 (8,62)
<i>Ésteres</i>			
Benzoato de metila	1095	0,03 – 1,05 (0,77)	0,17 – 0,75 (0,58)
Acetato de benzila	1166	0,06 – 0,56 (0,33)	0,18 – 0,85 (0,51)
Propanoato de benzila	1260	0,12 – 0,52 (0,30)	0,03 – 0,15 (0,09)
Isobutanoato de benzila	1299	0,05 – 0,27 (0,18)	0,12 – 0,23 (0,17)
Metil 2-metóxi benzoato	1342	0,31 – 0,98 (0,57)	0,02 – 1,44 (0,47)
Butanoato de benzila	1348	0,04 – 0,17 (0,09)	0,04 – 0,09 (0,07)
(E)-Metil cinamato	1385	0,14 – 0,30 (0,22)	0,27 ^a
Benzil 2-metilbutanoato	1388	0,40 – 1,51 (0,85)	0,15 – 0,78 (0,47)
Não identificados		0,01 – 0,05 (0,02)	---
Compostos de cadeia C5 ramificada			
<i>Álcoois</i>			

2-Metilbutanol	Na	---	0,13 ^a
<i>Ésteres</i>			
(Z)-3-Hexenil 3-metilbutanoato	1234	0,02 – 0,10 (0,06)	0,04 ^a
Compostos cíclicos diversos			
<i>Furanos</i>			
2,5-dimetiltetrahydrofurano	na	0,12 – 0,66 (0,28)	0,15 – 0,60 (0,27)
<i>Piranonas</i>			
2,2,6-trimetil-6-vinildihidro-2H-piran-3(4H)-ona	1108	0,33 ^a	0,24 – 0,33 (0,29)
Terpenos			
<i>Terpenos irregulares</i>			
6-Metil-5-hepten-2-ona	988	0,12 – 0,50 (0,24)	0,25 – 0,57 (0,36)
<i>Monoterpenos</i>			
Mirceno	991	0,03 – 0,07 (0,05)	0,05 ^a
(Z)-β-Ocimeno	1039	0,45 – 0,86 (0,63)	0,27 – 0,82 (0,48)
(E)-β-Ocimeno	1049	1,39 – 5,68 (2,80)	0,40 – 2,40 (1,35)
Óxido de cis-linalol (furanoide)	1072	7,41 – 16,85 (12,24)	22,74 – 38,20 (29,52)
Óxido de trans-linalol (furanoide)	1088	0,19 – 0,47 (0,30)	0,30 – 0,61 (0,49)
Linalol	1100	32,81 – 54,88 (45,06)	19,37 – 41,04 (27,40)
(3E,5E)-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	1131	0,03 – 0,012 (0,08)	---
Óxido de cis-linalol (piranoide)	1169	5,27 – 9,44 (7,37)	8,28 – 13,21 (10,26)
Óxido de trans-linalol (piranoide)	1174	1,16 – 4,00 (2,16)	1,79 – 2,56 (2,17)
Citronelol	1229	0,02 – 0,04 (0,03)	---
(E)-Geranil acetona	1455	0,03 – 0,04 (0,04)	0,09 ^a
Desconhecido <i>mz</i> 91,119,40,43,134	1209	0,04 – 0,53 (0,21)	0,05 – 0,21 (0,13)
Não identificados		0,18	0,11
<i>Sesquiterpenos</i>			
α-Copaeno	1378	0,04 – 0,07 (0,05)	---

<i>(Z,E)</i> - α -Farneseno	1497	0,32 – 1,65 (0,77)	0,03 – 0,29 (0,11)
<i>(E,E)</i> - α -Farneseno	1510	10,30 – 27,81 (17,38)	10,59 – 22,35 (16,17)
<i>(E)</i> -Nerolidol	1566	0,02 ^a	---
<i>(2Z,6E)</i> -Farnesol	1724	0,04 – 0,18 (0,11)	---
Demais compostos não-identificados		0 – 0,46 (0,13)	0 – 0,35 (0,16)

Tabela 2. Quantidade absoluta (%) dos principais componentes do buquê floral de *Amburana cearensis* (Fabaceae). Letras diferentes corresponde a diferença estatística significativa ($\alpha= 5\%$).

Composto	Dia/Noite	Teste estatístico		
		t/U	g.l.	p
Alifáticos	0/0.23	-	-	-
Benzenóides	10.95/11.42	54	-	0.9439
Álcool benzílico	60.55/51.71	-0.40	12	0.69
Cadeia - C5	0.06/0.17	19	-	0.5186
Miscelâneos cíclicos	0.61/0.56	23	-	0.8973
Terpenos	89.87/ 88.73	126	-	0.2337
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	22.40/8.11	2.12	12	0.55
Linalol óxido <cis-> (furanóide)	97.93 ^b /177.10 ^a	-6.35	12	<0.0001
Linalol	360.45 ^a /164.41 ^b	3.87	12	0.0022
Linalol óxido <cis-> (piranóide)	59.00 ^b /61.56 ^a	-3.34	12	0.005
Linalool óxido <trans-> (piranóide)	17.30/13.01	19	-	0.51
(<i>E,E</i>)- α -Farneceno	139.06/97	0.43	12	0.67
Não identificados	0.65 ^a /0.22 ^b	30.50	-	0.0166

Tabela 3. Visitantes florais de *Amburana cearensis* (Fabaceae) em área de Caatinga no sertão de Pernambuco. Fr.abs. = frequência absoluta de visitas. Tabela adaptada de Barral *et al.* (em prep; capítulo 1).

Visitante floral	Período visita	Fr. Abs.
Lepidoptera		
Mariposas	noturno/diurno	352/123
Borboletas	diurno	103
Hymenoptera		
Abelhas	diurno	39

Figuras

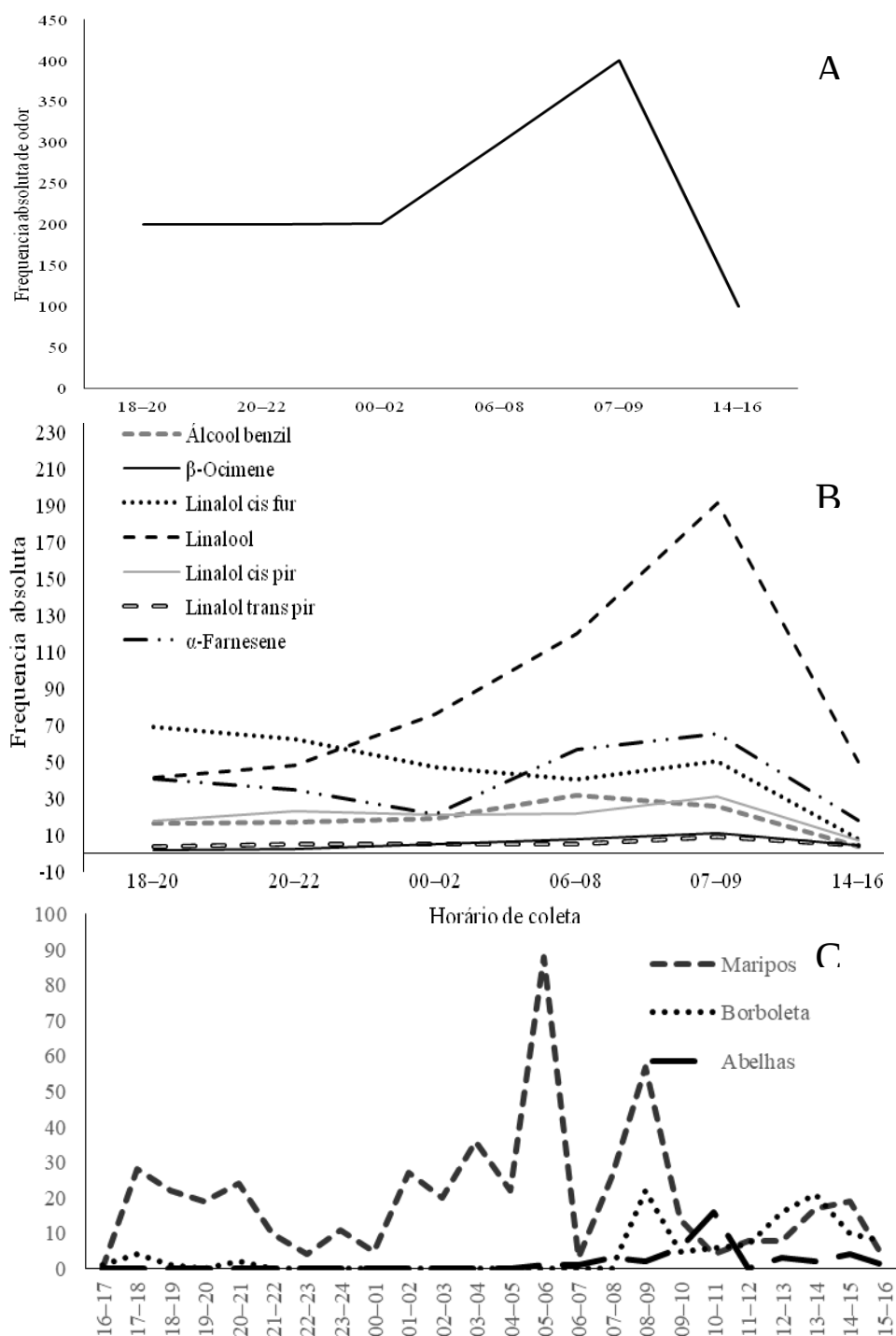


Figura 1. Distribuição dos voláteis do buquê do odor floral de *Amburana cearensis* durante o período de antese. A – Voláteis totais; B – Voláteis dominantes: Álcool benzílico, (E)- β -Ocimeno, Linalol óxido cis furanóide, Linalol, Linalol óxido cis piranóide, Linalol óxido trans piranóide e (E,E)- α -Farneseno; C – Frequência de visitas, adaptado de Barral *et al.* (em prep; capítulo 1).

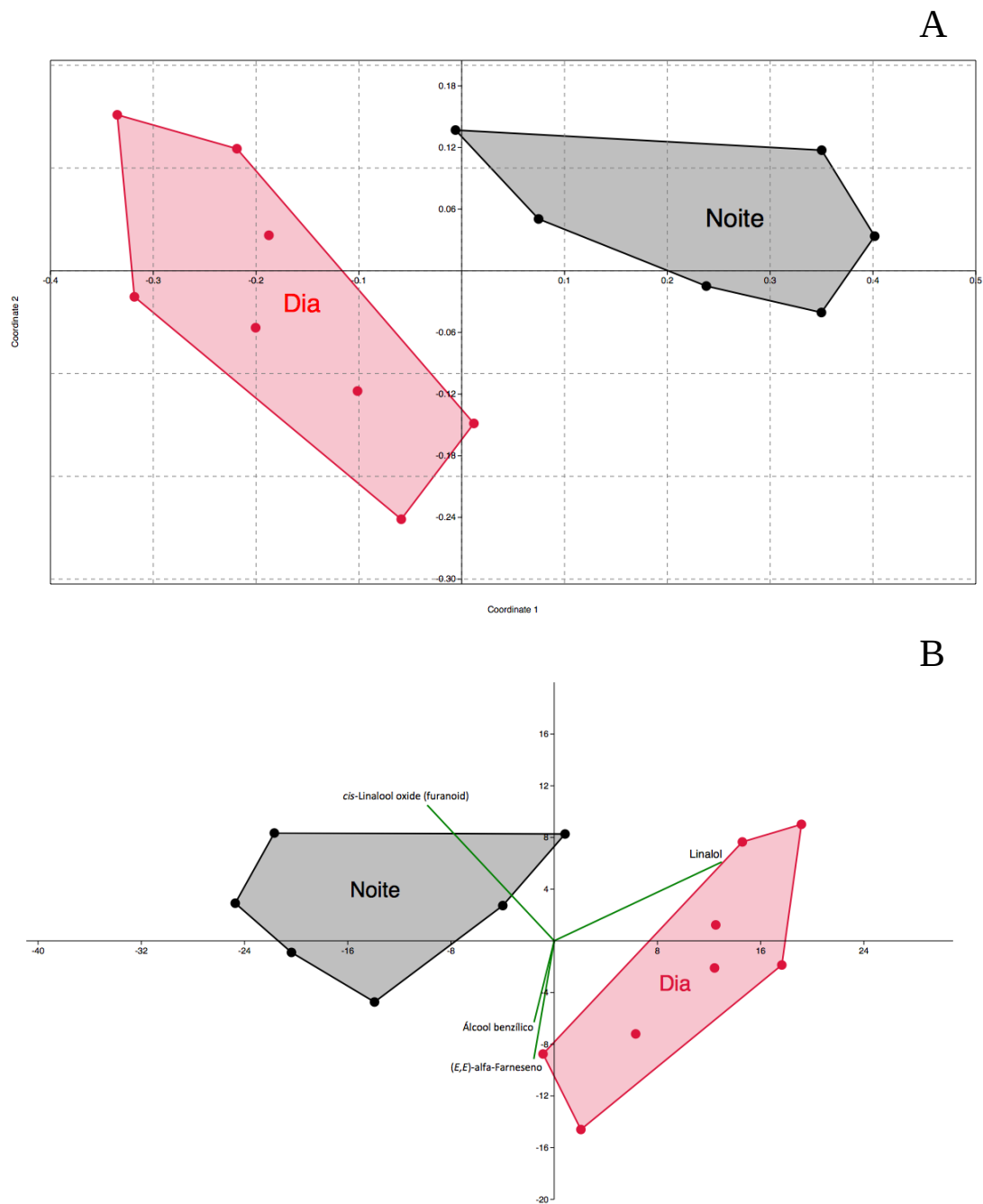


Figura 2. Análise de gradiente NMDS dos voláteis do buquê floral de *Amburana cearensis* durante o dia e a noite (A) e análise de PCA considerando os principais compostos emitidos durante a antese.

5 ESTRUTURA DIAMÉTRICA E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE *AMBURANA CEARENSIS* (ALLEMÃO) A.C. SM. (FABACEAE) EM ÁREAS DE CAATINGA

Elivania Conceição Barral¹, Oswaldo Cruz Neto¹, Laís Angélica de Andrade Pinheiro Borges²
& Ariadna Valentina Lopes^{1,3}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, Rua Prof. Nelson Chaves s/n, 50372-970, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Universidade Federal da Paraíba, Campus III, Departamento de Ciências Biológicas, Areia, Paraíba, Brasil.

³ Autor para correspondência: avflop@ufpe.br

Resumo

Fragmentação e degradação em diferentes ecossistemas tem causado alterações sobre a estrutura e dinâmica das populações vegetais e o estudo demográfico tem auxiliado na compreensão dessa dinâmica. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever a estrutura populacional e a distribuição espacial da espécie madeireira ameaçada de extinção *Amburana cearensis* (Fabaceae) em duas áreas de caatinga no sertão de Pernambuco, NE – Brasil. Medidas de diâmetro e altura foram registradas para ambas as populações durante três censos anuais consecutivos. A estrutura populacional foi analisada através de classes diamétricas e relações alométricas foram descritas. A distribuição espacial foi definida através do índice de Morisita. As populações mostraram estruturas populacionais ajustadas a curva do “J-invertido” com valores expressivos dos coeficientes de determinação. A relação entre diâmetro ao nível do solo (DNS) e altura foi positiva e significativa. O padrão de distribuição espacial diferiu entre as áreas variando de agregado a uniforme. Irregularidades na frequência das classes diamétricas foram observadas, contudo o elevado ajuste exponencial indica que ambas as populações continuaram autorregenerantes ao longo dos censos. Apesar da correlação positiva altura/DNS, indivíduos na Área I apresentaram menor porte, o que pode estar relacionado ao tipo de solo ou maior suscetibilidade a perturbação antrópica. Distribuição espacial agregada foi predominante, contudo o padrão regular foi observado para os adultos na Área II indicando uma relação com competição por recursos limitantes (*eg*: água) e/ou potencial alelopático. O tipo de solo, restrição hídrica e atividade antrópica parecem estar refletindo sobre a densidade, o balanço recrutamento/mortalidade, o porte dos indivíduos e o padrão de distribuição espacial das populações de forma que sugere-se a criação de áreas para conservação e de planos de manejo com uso racional respeitando os limites regenerativos e produtivos de *A. cearensis*.

Palavras-chave: Caatinga de areia e cristalino, distribuição espacial, estrutura populacional diamétrica, atividade antrópica

Introdução

Perturbação antrópica tem sido a principal causa de alterações nas condições de sobrevivência e desenvolvimento de plantas, da descaracterização e perda de habitat e de distúrbios em serviços ecológicos (Saunders *et al.* 1991; Burton *et al.* 2009; Melo *et al.* 2010; Tang *et al.* 2011; Dicks *et al.* 2016). Tais mudanças através do extrativismo e diversos usos da terra pelo homem têm resultado na fragmentação e degradação de diferentes ecossistemas, causando alterações sobre a estrutura e dinâmica das populações vegetais (Tang *et al.* 2011; Rodrigues *et al.* 2016).

Tais populações, tem reagido a diferentes fatores bióticos e abióticos e o estudo demográfico, principal ferramenta para compreensão da dinâmica populacional (Silvertown *et al.* 1993), tem auxiliado o entendimento de como a perda de serviços ecossistêmicos, perturbação antrópica e fragmentação, tem modificado a estrutura das populações, assim como também tem indicado consequências futuras a longo prazo (Brys *et al.* 2003; Martorell & Peters 2005; de Crop *et al.* 2012). Portanto, é substancial no desenvolvimento de iniciativas voltadas à conservação e estratégias de manejo (Bruna & Kress 2002; Tang *et al.* 2011).

Na Caatinga ações antrópicas têm levado a um acentuado processo de degradação reduzindo áreas contínuas de vegetação tornando espécies vegetais e animais vulneráveis ou em perigo de extinção (Andrade-Lima 1981; Casteletti *et al.* 2003; Giuliatti *et al.* 2003; Leal *et al.* 2005). *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. é uma Leguminosae típica de Caatinga ameaçada de extinção (Americas Regional Workshop 1998; CNCFlora 2012; IUCN 2016) de reconhecido valor socioeconômico e biológico (e.g. Leal *et al.* 2005; 2006; Kill 2010; Catão *et al.* 2011; Bitu *et al.* 2015).

Nas áreas de ocorrência natural da espécie o corte seletivo e ilegal pela comunidade local tem gerado a vulnerabilidade da espécie no Brasil (CNCFlora 2012) visto que sua madeira tem grande potencial na medicina popular (Bitu *et al.* 2015) e madeireiro local como também por seu valor no comércio internacional (ABP Comércio & Importação Ltda 2016). Sabendo que o corte seletivo de madeira altera a estrutura populacional de espécies arbóreas (e.g. Johns 1988; Hall *et al.* 2003; Osazuwa-Peters *et al.* 2015; Rodrigues *et al.* 2016), objetivou-se realizar o estudo da estrutura e distribuição populacional de *Amburana cearensis* em duas áreas de Caatinga sob perturbação.

Material e métodos

Local de estudo e espécie estudada

O local de estudo é composto por duas áreas distintas, conhecidas pela população residente como Olho D'Água e Serrote e distam aproximadamente 8 km uma da outra. Ambas encontram-se no município de Parnamirim (08°05'26"S, 39°34'42"O), Pernambuco, que está inserido na unidade geoambiental da Depressão Sertaneja e apresenta vegetação basicamente composta por Caatinga Hiperxerófila com trechos de Floresta Caducifólia. O clima é do tipo Tropical Semi-Árido, com chuvas de verão entre novembro a abril e precipitação média anual de 431,8 mm (CPRM – Serviço Geológico do Brasil 2005).

A Área I (8°08.267'S, 39°35.751'O), conhecida como Olho D'Água, é uma caatinga de areia que apresenta poucas propriedades em meio a vegetação e fica próxima a uma unidade de extração mineral, que segundo os moradores locais esteve ativa por cerca de seis anos (2008–2014). Atividades de pastoreio e extrativismo é evidenciada pela presença de caprinos, bovinos e equinos e pelos sinais visíveis de cortes parcial e total de árvores, inclusive *A. cearensis*, para variados fins. Extrativismo mineral de rochas graníticas, também é realizado pela comunidade local (Figura 1). A Área II (8°05.996'S, 39°31.731'O), chamada Serrote, está inserida numa caatinga de cristalino e apresenta moradias na região circundante à vegetação. A atividade de caprinos e bovinos está presente, contudo atividade antrópica em meio as parcelas não foram observadas durante os anos de pesquisa (2013-2015) (Figura 2).

Amburana cearensis (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae) é uma leguminosa arbórea de pequeno a médio porte na Caatinga, popularmente conhecida como cerejeira, amburana, imburana-de-cheiro ou cumaru (Leite 2005, MMA 2012). Apresenta distribuição exclusivamente sul-americana, encontrando-se principalmente no Brasil, em diferentes tipos de vegetação desde Caatinga à Floresta Estacional Semidecidual (Leite 2005, Seleme *et al.* 2015). O centro de distribuição da espécie é o nordeste brasileiro, sendo uma árvore típica da Caatinga de importância socioeconômica, usada em produtos madeireiros no mobiliário fino, artesanato e tanoaria (Rizzini 1978, Catão *et al.* 2011, MMA 2012) e não-madeireiros como fitoterápico na medicina popular e fitocosméticos na fabricação de sabonetes e fixador de perfumes (Leal *et al.* 2000, 2005, 2006; MMA 2012; Bitu *et al.* 2015). Como consequência principalmente da exploração madeireira, além da perda de habitat, a espécie encontra-se atualmente em perigo de extinção (Americas Regional Workshop 1998; CNCFlora 2012; IUCN 2016).

Estrutura populacional e distribuição espacial

As duas populações de *Amburana cearensis*, uma na Área I e outra na Área II, foram acompanhadas através de censos anuais no município de Parnamirim, Pernambuco, durante três anos. No total 31 parcelas de 300 m² (10 m x 30 m) foram montadas aleatoriamente seguindo uma trilha em meio a caatinga, com distância de no mínimo 50 metros entre elas, para registro do número de indivíduos, da altura e do perímetro ao nível do solo (PNS). As circunferências do caule foram tomadas com auxílio de fita métrica e a partir da transformação dos dados de circunferência, foi calculado o raio ($R = C/2\pi$) para obter-se o DNS.

Os dados de altura foram obtidos a partir de fita métrica ou trena no caso de plântulas e plantas jovens com até 2 m de comprimento. Indivíduos maiores, as alturas foram estimadas através de dois operadores por meio de avaliação visual, neste caso um dos operadores ficou apoiado a árvore e serviu como referência para o segundo operador que realizou todas as medições usando este tipo de escala (Curto *et al.* 2013). Esses indivíduos foram classificados quanto ao seu estágio de desenvolvimento em regenerantes e adultos. Como adultos foram considerados todos os espécimes que apresentaram material reprodutivo ou resquícios destes, ou perímetro na altura do peito (PAP) ≥ 40 cm (MMA, 2012) que corresponde à aproximadamente 13 cm de diâmetro na altura do peito (DAP, à 1,30 m do solo). Os demais indivíduos foram considerados regenerantes. Além disso, durante dois censos foram registradas nas parcelas a quantidade de plântulas, que foram marcadas e acompanhadas quanto a presença e ausência a cada ano censitário.

A densidade foi calculada e para verificar diferenças estatísticas entre as áreas e numa mesma população ao longo dos censos, foi inicialmente testada a normalidade dos dados usando o teste Lilliefors, seguida de uma ANOVA 2 fatores (Sokal & Rohlf 1995; Zar 2010). Diferenças no número médio de adultos e regenerantes foram avaliadas dentro e entre as populações a partir da análise estatística ANOVA 1 fator (Sokal & Rohlf 1995; Zar 2010). Quanto ao número médio de plântulas foram aplicados os testes não-paramétricos de Wilcoxon, para análises dentro de uma mesma área, e o de Mann-Whitney para verificar diferenças significativas entre áreas distintas (Sokal & Rohlf 1995; Zar 2010). Comparações na frequência de parcelas contendo plântulas entre as áreas I e II foram feitas usando o teste G de aderência (Sokal & Rohlf 1995; Zar 2010).

Para avaliar a estrutura populacional, todos os indivíduos amostrados foram distribuídos em classes de frequência de diâmetro e altura, cujo número de classes foi obtido pela fórmula de Sturges e o intervalo das classes através do método das variáveis contínuas

(Arango 2005). As distribuições de frequência de cada parâmetro avaliado, altura e diâmetro dos indivíduos, foram usadas na elaboração de gráficos de dispersão e comparadas entre os dois fragmentos (Área I/Área II). As distribuições em classes de tamanho foram comparadas e ajustadas ao modelo “J-invertido” (ou exponencial negativa, $y = a \cdot e^{-bx}$) por regressão linear simples (Sokal & Rohlf 1995; Zar 2010). Comparações entre e dentro de uma mesma população durante os anos censitários foi feita através do teste Kolmogorov-Smirnov (2-n) e Kruskal Wallis, respectivamente (Sokal & Rohlf 1995; Zar 2010).

Taxa de mortalidade e de recrutamento populacional anual foi calculada segundo Sheil *et al.* (1995, 2000). Além disso, coeficientes “q” de Liocourt foram calculados para analisar a relação mortalidade/crescimento dos indivíduos por meio de classes diamétricas (Meyer *et al.* 1961). As relações alométricas entre diâmetro ao nível do solo (DNS) e altura foram avaliadas pelo teste de regressão linear simples. Diferenças na estatura dos indivíduos entre as áreas para os censos realizados foi verificada através da análise paramétrica teste t de Student (Sokal & Rohlf 1995; Zar 2010). Todos os testes estatísticos foram realizados com auxílio do programa BioEstat v.5.3 (Ayres *et al.* 2007), com nível de significância de 5% para um teste bicaudal. O estudo do padrão de distribuição espacial foi realizado para as duas populações e, também, por classes de diâmetro. Para a análise do padrão de distribuição espacial, foi utilizado o Índice de Dispersão de Morisita (I_d) (Morisita 1962) e o nível de significância do índice ($I_d \neq 1$) foi avaliada através do teste qui-quadrado (χ^2), a 5% de probabilidade (Poole 1974).

Resultados

Na Área I um total de 72 indivíduos foram encontrados ao final de três censos realizados nas 15 parcelas amostradas, contra 54 indivíduos encontrados nas 16 parcelas na Área II. A densidade variou de 160 indivíduos.ha⁻¹ na Área I a 112 indivíduos.ha⁻¹ na Área II, sendo estatisticamente maior na primeira ($F = 48,0769$; g.l. = 1; $p = 0,0166$). A densidade populacional dentro de uma mesma área se manteve estatisticamente semelhante ao longo dos censos ($F = 0,3077$; g.l. = 2; $p = 0,7643$), com acréscimos de poucos indivíduos anualmente (Tabela 1).

O número de adultos e jovens variou sutilmente ao longo dos censos, não havendo diferença estatística entre os anos tanto na Área I (Regenerantes: $F = 0,0994$; $p = 0,9051$ / Adultos: $F = 0,0637$; $p = 0,9381$) quanto na Área II (Regenerantes: $F = 0,0205$; $p = 0,9805$ / Adultos: $F = 0,5167$; $p = 0,6054$). A Área I, entretanto, apresentou maior número de indivíduos adultos ($F = 25,4737$; g.l. = 1; $p = 0,0337$) e regenerantes ($F = 60,3077$; g.l. = 1; $p = 0,0128$) que a

Área II. Quanto ao número médio de plântulas não houve diferença significativa entre as áreas no primeiro ($U= 110,5$; $p= 0,7073$) e no segundo ($U= 104$; $p= 0,5271$) ano de observação, assim como não houve diferença significativa no número de plântulas dentro de uma mesma área entre os anos censitários (Área I: $Z= 0,5345$; $p= 0,1763$ / Área II: $Z= 1,3522$; $p= 0,1763$). Vale ressaltar que não houve diferença significativa na frequência de parcelas contendo plântulas entre as áreas no primeiro ($G_{Yates}= 0,0461$; $p= 0,83$) e no segundo ($G_{Yates}= 0,2482$; $p= 0,6183$) ano de observação.

Ambas as áreas apresentaram estruturas populacionais ajustadas a curva do “J-invertido” com valores expressivos dos coeficientes de determinação (R^2) em relação ao ajuste exponencial negativo (Figura 3). A estrutura populacional entre as áreas diferiu entre si para o primeiro ano censitário ($K-S= 0,2559$; $p< 0,05$), o que não ocorreu no segundo ($K-S= 0,2143$; $p> 0,05$) e no terceiro ($K-S= 0,2266$; $p> 0,05$) censo realizado. Ganhos e perdas no número de indivíduos sem promover diferenças significativas na estrutura populacional entre os anos de censo numa mesma população foram observadas na Área I ($H= 0,0359$; g.l.= 2; $p= 0,9822$) e na Área II ($H= 0,7308$, g.l.= 2; $p= 0,6939$).

Quanto a taxa de recrutamento, ambas as populações mostraram acréscimos de indivíduos, com exceção do terceiro censo realizado na Área II, na qual não houve recrutamento. Nenhuma diferença significativa para este parâmetro entre as áreas foi observada (Intervalo entre 1º e 2º ano: $G= 0,1744$; $p= 0,6763$ / Intervalo entre 2º e 3º ano: $G= 0,2695$; $p= 0,6037$) (Tabela 1). Para taxa de mortalidade apenas para o primeiro ano de observação foi verificada diferença significativa entre as populações (Intervalo entre 1º e 2º ano: $g= 5,0361$; $p= 0,0248$ / Intervalo entre 2º e 3º ano: $G= 1,0888$; $p= 0,2967$), tendo a Área II apresentado maior taxa de mortalidade (11,11%) que a Área I. Índices “q” de Liocourt calculados e usados na avaliação de recrutamento, estão apresentados na Figura 3. A população na Área I apresentou o quociente de Liocourt “q” médio de $0,67 \pm 0,004$ (Censo 1: 0,66/ Censo 2: 0,67/ Censo 3: 0,67) e de $0,87 \pm 0,03$ na Área II (Censo 1: 0,91/ Censo 2: 0,84/ Censo 3: 0,85) (Figura 3).

A relação entre diâmetro ao nível do solo (DNS) e altura foi positiva e significativa para ambas as áreas, com valores altos do coeficiente de determinação (R^2), mostrando um ajuste médio ao modelo linear de 66% para Área I e de 61% para Área II, quando se considera todos os censos. A estatura média dos indivíduos diferiu entre as áreas, apresentando maior porte na Área II do que na Área I para todos censos realizados (Censo 1: $t= -2,8960$, g.l.= 118; $p= 0,0045$ / Censo 2: $t= -2,8246$; g.l.= 118; $p= 0,0055$ / Censo 3: $t= -3,0245$; g.l.= 114; $p= 0,0031$) (Figura 4).

A distribuição espacial variou entre as áreas analisadas e variou entre os estágios de vida (regenerantes e adultos) apenas para a Área II. Os dados obtidos usando o índice de dispersão de Morisita indicou distribuição espacial agregada para a população na Área I, tanto para os indivíduos adultos ($Id= 1,26$; $\chi^2= 24,5$; $p< 0,05$) quanto para os regenerantes ($Id= 1,74$; $\chi^2= 36,25$; $p< 0,05$), mesmo quando analisados em conjunto ($Id= 1,53$; $\chi^2= 48,54$; $p<0,05$) ou separadamente. A Área II, entretanto, mostrou distribuição agregada para os regenerantes ($Id= 2,33$; $\chi^2= 39,10$; $p< 0,05$) e para toda a população sem distinção do estágio de vida ($Id= 1,03$; $\chi^2= 17,11$; $p< 0,05$) e apresentou distribuição regular/uniforme para os adultos ($Id= 0,77$; $\chi^2= 7,51$; $p<0,05$), independente do ano censitário analisado.

Discussão

Amburana cearensis é uma espécie comum na vegetação secundária (MMA 2012), que é resultante de processos naturais de sucessão, após supressão total ou parcial de vegetação primária por ações antrópicas ou causas naturais (CONAMA 1994). Além disso, a abundância populacional de uma espécie pode variar de acordo com a fitofisionomia ou grau de conservação do ambiente (Fabricante *et al.* 2009), podendo a densidade de algumas espécies aumentar, conforme o nível de degradação se eleva (Galindo *et al.* 2008). Assim, a maior densidade de indivíduos de *A. cearensis* encontrada na Área I pode estar relacionada ao grau de atividade antrópica ocorrente nesta área.

Ambas as populações apresentaram distribuição das classes diamétricas seguindo o padrão geral em forma de “J-invertido”, com alguns desvios na estrutura verificadas pela variação nos valores do coeficiente “q” de Liocourt ao longo das classes de tamanho. Esse tipo de padrão é comumente observado em espécies arbóreas (Nascimento *et al.* 2004; Faleiro & Schiavini 2009) e tem sido encontrado para espécies de caatinga, de cerrado e de florestas tropicais (*e.g.* Harper 1990; Bernasol & Lima-Ribeiro 2010; Santana *et al.* 2011). Tal distribuição exponencial negativa (“J-invertido”) indica um balanço positivo entre recrutamento e mortalidade, sendo típica de populações autorregenerativas, para as quais é observado indivíduos menores substituírem, sucessivamente, os indivíduos adultos na população.

Ambas as áreas mostraram alto coeficiente de determinação ao ajuste exponencial negativo, entretanto uma diferença significativa na estrutura populacional para o primeiro ano de observação indica que a população na Área I ($R^2= 0,82$) estava mais balanceada que na Área II ($R^2= 0,67$), verificado pelo decréscimo mais uniforme do número de indivíduos entre

as diferentes classes de tamanho na estrutura da população na Área I. Irregularidades na frequência das classes diamétricas e um “q” de Licourt variável sugerem desequilíbrio entre mortalidade e recrutamento (Alves Junior *et al.* 2010; Bernasol & Lima-Ribeiro 2010) e podem indicar possíveis perturbações passadas de origem natural ou antrópica, tais como herbivoria e corte seletivo (Felfili & Silva Júnior 1988). Assim, as irregularidades e o menor ajuste ao padrão em forma de “J-invertido”, observados na estrutura diamétrica na Área II provavelmente é reflexo de perturbações passadas nesta população. Quanto ao segundo e terceiro censo ambas as populações apresentaram-se semelhantes em estrutura populacional mostrando decréscimo uniforme na frequência das classes diamétricas e elevado coeficiente de determinação exponencial, sugerindo que as populações continuaram autorregenerantes.

Recrutamento é definido como a entrada de novos organismos em uma população ou comunidade (Ribbens *et al.* 1994). Ao longo dos anos censitários ambas as populações mostraram acréscimos de indivíduos, com exceção do terceiro censo realizado na Área II, para o qual não houve recrutamento. Limitações no recrutamento podem ocorrer em múltiplos processos nos vários estágios da história de vida (*eg.* produção, dispersão e viabilidade de sementes, competição por espaço e recursos, predação e herbivoria) (Clark *et al.* 1999), entretanto limitações no processos durante e pós dispersão são criticamente importantes, uma vez que não há recrutamento sem a chegada e estabelecimento de sementes (Nathan & Muller-Landau 2000; Clark *et al.* 2013). *Amburana cearensis* é uma espécie com floração supra-anual (Machado *et al.* 1997; Barral *et al.* em preparação; capítulo 1 desta tese) não repondo, consequentemente, o banco de sementes anualmente. Além disso, apresenta padrão de dispersão anemocórico o que pode limitar a dispersão a longas distâncias (Cunha & Ferreira 2003; Leite 2005; Silva & Rodal 2009; Kiill & Lima 2011). A falha em atingir locais adequados (*seeds limitation*) e a falta de locais adequados (*establishment limitation*) para o estabelecimento de sementes e plântulas afetam diretamente a dinâmica populacional (Eriksson & Ehrlén 1992; Muller-Landau *et al.* 2002; Nathan & Muller-Landau 2000; Muller-Landau *et al.* 2002) e podem ser, provavelmente, as causas da ausência de recrutamento na Área II.

Taxas de recrutamento que mostraram-se superiores às correspondentes taxas de mortalidade, tem resultado em aumento geral da densidade para algumas espécies arbóreas (*e.g.* Sanquetta *et al.* 2003). Para a população na Área II as baixas taxas de recrutamento e inferiores as taxas de mortalidade se refletem na menor densidade observada neste local. Embora a taxa de mortalidade tenha sido maior que a de recrutamento, o déficit de indivíduos se deve à causa natural, visto que não houve evidências de ação antrópica. Além disso,

redução no número de indivíduos entre os inventários pode ser determinada por variações nas condições ambientais e/ou em resposta aos distúrbios naturais (*e.g.* Pinto & Hay, 2005; Mews *et al.* 2011). Por outro lado, a taxa de mortalidade superior a de recrutamento observada no terceiro ano censitário na Área I, se deve em parte ao corte seletivo ativo neste local, inclusive dentro das parcelas.

Altos índices de correlação positiva entre a circunferência do caule e a altura da planta foram registrados, o que está de acordo com o padrão esperado para plantas que crescem em ambientes abertos (Spósito & Santos 2001), assim como as áreas de caatinga onde ocorrem as populações de *A. cearensis* aqui estudadas. No entanto, os indivíduos localizados na Área II apresentaram maior porte que os da Área I. A menor estatura dos troncos na Área I pode estar relacionada ao tipo de solo, uma vez que Santos *et al.* (1992) estudando a vegetação de caatinga do sertão pernambucano, no município de Parnamirim, local do presente trabalho, indicou que as diferenças de solo se refletiram na vegetação quanto ao porte, densidade de plantas e de espécies. Além disso, o menor porte desses indivíduos pode indicar maior suscetibilidade a perturbação, visto que foram observados cortes da casca e de galhos nesta área ao longo dos censos. Vale ressaltar, que solos do tipo Planossolo e Bruno Não-Cálcico, como o da Área II, apresentaram maior densidade e altura de lenhosas no estudo realizado por Santos *et al.* (1992), que atribuiu tais resultados a disponibilidade de água e ao percentual de cascalho nas camadas superficiais do solo (Santos *et al.* 1992).

Sem a distinção entre regenerantes e adultos, ambas as populações exibiram agregação quanto ao padrão de distribuição espacial e tal característica pode estar relacionada ao padrão anemocórico de dispersão e às características físicas da semente alada de *A. cearensis*, o que limitaria a distância em que as sementes seriam dispersas da planta mãe. Contudo, apenas na Área II foi observado que os adultos tendem a apresentar um padrão de distribuição uniforme enquanto os regenerantes tendem a agregação. Segundo Silva *et al.* (2009) é comum dentro de uma mesma população ocorrerem diferenças na distribuição espacial relacionadas a classes de tamanho e estádios de desenvolvimento. Além disso, ainda segundo Silva *et al.* (2009) espécies com alta taxa de mortalidade dependente de densidade, o padrão espacial dos adultos tende a ser menos agregado que os das plântulas.

A distribuição espacial regular é possível, porém as plantas raramente se distribuem dessa maneira na natureza (Barbour *et al.* 1987; Legendre & Fortin, 1989). Esse padrão tende a ocorrer em ambiente com recursos limitados, onde ocorre uma severa competição, ou por efeitos de autotoxicidade ou inibição biológica (Silva *et al.* 2009). Dessa forma, o padrão uniforme encontrado na área conservada para os adultos de *A. cearensis* pode estar

relacionado ao potencial alelopático das sementes que apresentam cumarina, composto fenólico inibidor natural do processo de germinação (Berrie *et. al.* 1968) ou mesmo como resultado de competição pelo principal recurso limitante da Caatinga, a água.

De uma forma geral foi possível verificar diferenças entre as áreas estudadas quanto a densidade populacional, ao porte dos indivíduos e ao padrão de distribuição espacial. A Área I apresentou maior densidade populacional mostrando que o grau de perturbação nesta área tem favorecido o recrutamento, apesar de exibirem indivíduos com menor estatura, o que pode estar relacionado ao tipo de solo ou maior suscetibilidade a atividade antrópica observada nesta área. A Área II, entretanto, apresentou menor densidade populacional, a qual foi atribuída a reflexos de perturbações passadas. Em adição, os indivíduos na Área II exibiram maior porte e um padrão de distribuição espacial mais complexo que difere de acordo com o estágio de desenvolvimento dos indivíduos, tais características foram relacionadas principalmente ao tipo de solo e à competição por recursos limitantes (*eg*: água) e/ou potencial alelopático, respectivamente. Sabendo, portanto, que a espécie não apresenta brotação após o corte (MMA 2012) e que em ambas as áreas os efeitos do tipo de solo, de recursos limitantes (água) e de perturbação antrópica têm afetado o balanço entre recrutamento/mortalidade de forma que taxas de mortalidade superiores ao recrutamento têm refletido na menor densidade nas populações estudadas sugere-se a indicação de áreas prioritárias a conservação da espécie e um plano de manejo racional respeitando capacidade regenerativa e a produtividade de *Amburana cearensis*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brasil) pela bolsa concedida a E.C. Barral, a Eurico Lustosa e equipe da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim (EAIP) – UFRPE, Brasil pela estrutura e apoio no trabalho de campo.

Referências

ABP Comércio e Importação LTDA. Cerejeira (*Amburana Caerensis*) in Exportação de Madeira do Brasil. Disponível em: <<http://www.abptrade.com.br/madeiras.htm>>. Acesso em 8 março 2017.

- Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica). 1998. *Amburana cearensis*. In: IUCN 2007 Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 March 2008.
- Andrade-Lima, D. 1981. The caatingas dominium. *Revista Brasileira de Botânica* 4: 149-153.
- Arango, H.G. *Bioestatística: teórica e computacional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- Ayres, M., Ayres-Jr., M., Ayres, D. L., Santos, A. S., 2007. *BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDS/MCT/CNPq. Belém.
- Barbour, M.G., Burk, J.H. & Pitts, W.D. 1987. *Terrestrial Plant Ecology*. 2 ed. Benjamim/Cummings, Menlo-Park.
- Bernasol, W.P. & Lima-Ribeiro, M.S. 2010. Estrutura espacial e diamétrica de espécies arbóreas e seus condicionantes em um fragmento de cerrado sentido restrito no sudoeste goiano. *Hoehnea* 37(2): 181-198.
- Berrie, A.M.; Parker, B.A.; Knights, W. & Hendrimn, M.R. 1968. Studies on lettuce seed germination. I. Coumarin induced dormancy. *Phytochemistry* 7: 567-573.
- Bitu, V.C.N., Bitu, V.C.N., Matias, E.F.F., Lima, W.P., Portelo, A.C., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A. 2015. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public Markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 172: 265–272.
- Breed, M.F., Ottewell, K.M., Gardner, M.G., Marklund, M.H.K., Dormontt, E.E. & Lowe, A.J. 2015. Mating patterns and pollinator mobility are critical traits in forest fragmentation genetics. *Heredity* 115: 108–114.
- Bruna, E.M. & Kress, W.J. 2002. Habitat fragmentation and the demographic structure of na amazonian understory herb (*Heliconia acuminata*). *Conservation Biology* 16(5): 1256-1266.
- Brys, R., Jacquemyn, H., Endels, P., Hermy, M. & de Blust, G. 2003. The relationship between reproductive success and demographic structure in remnant populations of *Primula veris*. *Acta Oecologica* 24: 247-253.
- Burton, J.I., Zenner, E.K., Frelich, L.E. & Cornett, M.W. 2009. Patterns of plant community structure within and among primary and second-growth northern hardwood forest stands. *Forest Ecology Management* 258: 2556-2568.
- Castelletti, C. H. M., J. M. C. Silva, M. Tabarelli, e A. M. M. Santos. 2003. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. Pp 91–100 in J. M. C. Silva, M. Tabarelli,

- M. Fonseca e L. Lins, editores. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Catão, C. G., Paes, J. B., Gomes, J. P. & Araújo, G. T. 2011. Qualidade da madeira de cinco espécies florestais para o envelhecimento da cachaça. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 15(7): 741–747.
- CNCFlora. *Amburana cearensis* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Amburana cearensis](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Amburana%20cearensis)>. Acesso em 8 março 2017.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. 1994. Resolução Nº 28, de 7 de dezembro de 1994. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res94/res2894.html>>. Acesso em 12 abril 2017.
- CPRM – Serviço Geológico do Brasil 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Parnamirim, estado de Pernambuco. Org(s) J.C. Mascarenhas, B.A. Beltrão, L.C. Souza Junior, M.J. T. G. Galvão, S.N. Pereira, J. L. F. Miranda. Recife: CPRM/PRODEEM, 2005.
- de Crop, E., Brys, R. & Hoffmann, M. 2012. The impact of habitat fragmentation on the interaction between *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) and its specialized seed predator *Stenoptilia zophodactylus* (Pterophoridae, Lepidoptera). *Ecological Research* 27: 967-974.
- Dicks, L.V., Viana, B., Bommarco, R., Brosi, B., Arizmendi, M. de C., Cunningham, S.A., Galetto, L., Hill, R., Lopes, A.V., Pires, C., Taki, H. & Potts, S.G. 2016. Ten policies for pollinators: What governments can do to safeguard pollination services. *Science* 354 (6315): 975-976.
- Fabricante, J.R.; Feitosa, S.S.; Bezerra, F.T.C.; Feitosa, R.C. & Xavier, K.R.F. 2009. Análise populacional de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae Lindl.) na caatinga da região do Seridó nordestino. *Revista Brasileira de Biociências* 7(3): 285-290.
- Faleiro, W. & Schiavini, I. 2009. Ecologia populacional de *Faramea hyacinthina* Mart. (Rubiaceae) em duas formações florestais da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia – MG / Brasil. *Revista Científica da UFPA* 7(1): 1-17.
- Felfili, J.M. & Silva Júnior, M.C. 1988. Distribuição dos diâmetros numa faixa de cerrado na Fazenda Água Limpa (FAL) em Brasília, DF. *Acta Botanica Brasilica* 2: 85-104.
- Galindo, I.C.L.; Ribeiro, M.R.; Santos, M.F.A.V.; Lima, J.F.W.F. & Fereira, R.F.A.L. 2008. Relações solo-vegetação em áreas sob processo de desertificação no município de Jataúba, PE. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 32(3): 1283-1296.

- Harper, J.L. 1990. Population biology of plants. Academic Press, London.
- IUCN The Red List of Threatened Species. Version 2016-2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 19 September 2016.
- Johns, A.D. 1988. Effects of "selective" timber extraction on rain forest structure and composition and some consequences for frugivores and folivores. *Biotropica* 20(1): 31-37.
- Kiill, L.H.P. 2010. Plantas da Caatinga ameaçadas de extinção e sua associação com polinizadores. In: Semana dos Polinizadores, 2. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010.
- Leal, I.R., da Silva, J.M.C., Tabarelli, M. & Lacher Jr., T.E. 2005. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. In: Megadiversidade vol 1 n° 1.
- Leal, L.K.A.M., Nobre Júnior, H.V.; Cunha, G.M.A., Moraes, M.O., Pessoa, C., Oliveira, R.A., Silveira, E.R., Canuto, K.M. & Viana, G.S.B. 2005. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neuroscience Letters* 388: 86-90.
- Leal, L.K.M., Costa, M.F., Pitombeira, M., Barroso, V.M., Silveira, E.R., Canuto, K.M. & Viana, G.S.B. 2006. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. *Life Science* 79(1): 98-104.
- Legendre, P. & Fortin, M.J. 1989. Spatial pattern and ecological analysis. *Vegetatio* 80: 107-138.
- Leite, E.J. 2005. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr.Allem.) A.C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. *Journal for Nature Conservation* 13: 49-65.
- Martorell, C. & Peters, E.M. 2009. Disturbance-response analysis: a method for rapid assessment of the threat to species in disturbed áreas. *Conservation Biology* 23(2): 377-387.
- Melo, F.P.L., Pinto, S.R.R. & Tabarelli, M. 2010. Abundância de biodiversidade. *Scientific American Brasil*. 39: 60-65.
- Mews, H.A., Marimon, B.S., Maracahipes, L., Franczak, D.D. & Marimon Junior, B.H. 2011. Dinâmica da comunidade lenhosa de um Cerrado típico na região Nordeste do Estado de Mato Grosso, Brasil. *Biota Neotropica* 11: 73-82
- MMA, Ministério do Meio Ambiente. 2012. Versão preliminar do guia de boas práticas de extrativismo sustentável da imburana-de-cheiro (*Amburana cearensis*). In: realização de estudos técnicos com o objetivo de recomendar e promover boas práticas em extrativismo sustentável no bioma da caatinga, por meio de manejo não-madeireiro em 3 espécies:

- umburana de cambão (*Commiphora leptophloeos*), angico de caroço (*Anadenanthera colubrina*) e imburana de cheiro (*Amburana cearensis*), visando a certificação de produtos orgânicos. 17pp.
- Nascimento, A.R.T.; Felfili, J.M. & Meirelles, E.M. 2004. Florística e estrutura da comunidade arbórea de um remanescente de Floresta Estacional Decidual de encosta, Monte Alegre, GO, Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 18(3): 659-669.
- Osazuwa-Peters, O.L., Chapman, C.A. & Zanne, A.E. 2015. Selective logging: does the imprint remain on tree structure and composition after 45 years? *Conservation Physiology* 3(1): 1-12.
- Pinto, J.R.R. & Hay, J.D.V. 2005. Mudanças florísticas e estruturais na comunidade arbórea de uma floresta de vale no Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 28:523-539.
- Rizzini, C.T. 1978. Árvores e madeiras úteis do Brasil. Editora Edgar Blücher LTDA. São Paulo.
- Rodrigues, D.R., Bovolenta, Y.R., Pimenta, J.A. & Bianchini, E. 2016. Height structure and spatial pattern of five tropical tree species in two seasonal semideciduous forest fragments with different conservation histories. *Revista Árvore* 40(3): 395-405.
- Sanquetta, C.R.; Dalla Corte, A.P. & Eisfeld, R.L. 2003. Crescimento, mortalidade e recrutamento em duas florestas de Araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.) no estado do Paraná, Brasil. *Revista Ciências Exatas e Naturais* 5(1): 101-112.
- Santana, J.A.S.; Vieira, F.A.; Pacheco, M.V. & Oliveira, P.R.S. 2011. Padrão de distribuição e estrutura diamétrica de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Catingueira) na Caatinga do Seridó. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 11(1): 116-122.
- Santos, M.F.A.V.; Ribeiro, M.R.; Sampaio, E.V.S.B. 1992. Semelhanças vegetacionais em sete solos da caatinga. Brasília, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 27(2): 305-314.
- Saunders, D.A., Hobbs, R.J. & Margules, C.R. 1991. Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation: A Review. *Conservation Biology* 5(1) 18-32.
- Seleme, E.P., Lewis, G.P., Stirton, C.H., Sartori, A.L.B. & Mansano, V.F. 2015. A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa* 212 (4): 249–263.
- Sheil, D., Burslem, D.F.R.P. & Alder, D. 1995. The Interpretation and misinterpretation of mortality rate measures. *Journal of Ecology* 83(2): 331-333.

- Sheil, D., Jennings, S. & Savill, P. 2000. Long-term permanent plot observations of vegetation dynamics in Budongo, a Ugandan rain forest. *Journal of Tropical Ecology* 16: 765-800.
- Silva, K.E. da; Martins, S.V.; Santos, N.T. & Ribeiro, C.A.A.S. 2009. Padrões espaciais de espécies arbóreas tropicais. *In*: Martins, S. V. (Ed.). *Ecologia de florestas tropicais do Brasil*. Viçosa: UFV, 2009. p. 216-244.
- Silvertown, J.W., Franco, M., Pisanty, L. & Mendonza, A. 1993. Comparative plant demography: Relative importance of life-cycle componentes to the finite rate of increase in woody and herbaceous perennials. *Ecology* 81: 465-476.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3a Ed. W. H. Freeman and Co.: New York.
- Sposito, T.C. & Santos, F.A.M. 2011. Architectural patterns of eight *Cecropia* (Cecropiaceae) species of Brazil. *Flora* 196: 215-226.
- Tang, C.Q., Yang, Y., Ohsawa, M., Momohara, A., Hara, M., Cheng, S. & Fan, S. 2011. Population structure of relict *Metasequoia glyptostroboides* and its habitat fragmentation and degradation in south-central China. *Biological Conservation* 144: 279-289.
- Zar, J.H. 2010. *Biostatistical Analysis*

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros analisados em dois censos para duas populações de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae), uma em área preservada (Serrote) e outra em área perturbada (Olho D'água) localizadas em Parnamirim, PE.

Parâmetros	Área I			Área II		
	2013	2014	2015	2013	2014	2015
Número de indivíduos	66 ^a	70 ^a	67 ^a	54 ^a	50 ^b	49 ^b
Diâmetro médio	22.41	20.18	20.36	20.91	19.42	19.84
Nº de mortos	-	1	4	-	6	1
Nº de recrutas	-	5	1	-	2	0
TM (%.ano-1)	-	1.51	5.71	-	11.11	2
TR (%.ano-1)	-	7.14	1.49	-	4	0

Figuras

Figura 1. Área I, população natural de *Amburana cearensis* na comunidade Olho D'Água em Parnamirim, sertão de Pernambuco, NE-BR. A- Solo arenoso predominante na Área I; B- Extrativismo mineral feito pela comunidade local; C- Evidência de corte de indivíduos de *Amburana cearensis*; D- Vegetação em período chuvoso; E- Evidência do uso da casca pela comunidade local.



Figura 2. Área II, população natural de *Amburana cearensis* na comunidade Serrote, sertão de Pernambuco, NE-BR. A e B – Vegetação durante a estação de chuvosa, seta= indivíduo de *A. cearensis*; C e D – Vegetação na estação seca exibindo embasamento cristalino e solo pedregoso; E e F – Atividade de pastoreio por caprinos.

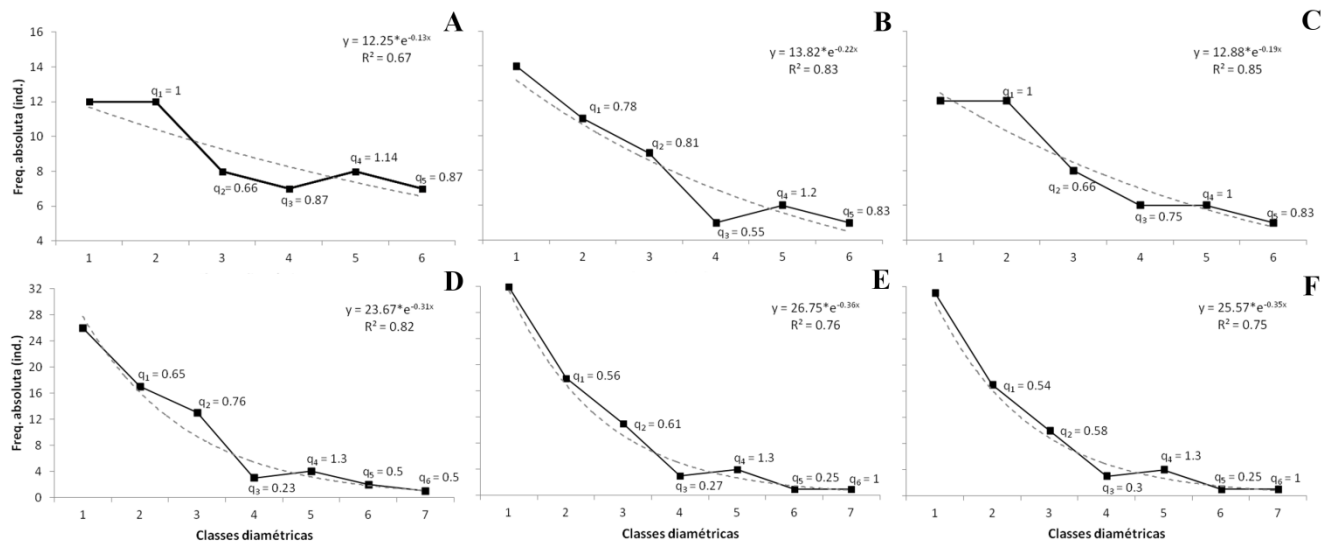


Figura 3. Distribuição de frequência dos indivíduos de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae), nas classes diamétricas, coeficiente de Liocourt (q) e coeficiente de determinação (R²) em vegetação de caatinga, nas populações localizadas na Área II (A – ano I, B- ano II e C – ano II) e Área I (D- ano I, E- ano II e F – ano III), em Parnamirim, no sertão de Pernambuco, Brasil. A linha contínua representa as frequências observadas e a linha tracejada, o ajuste à curva “J-invertido” (função exponencial negativa: $y = e^{-x}$).

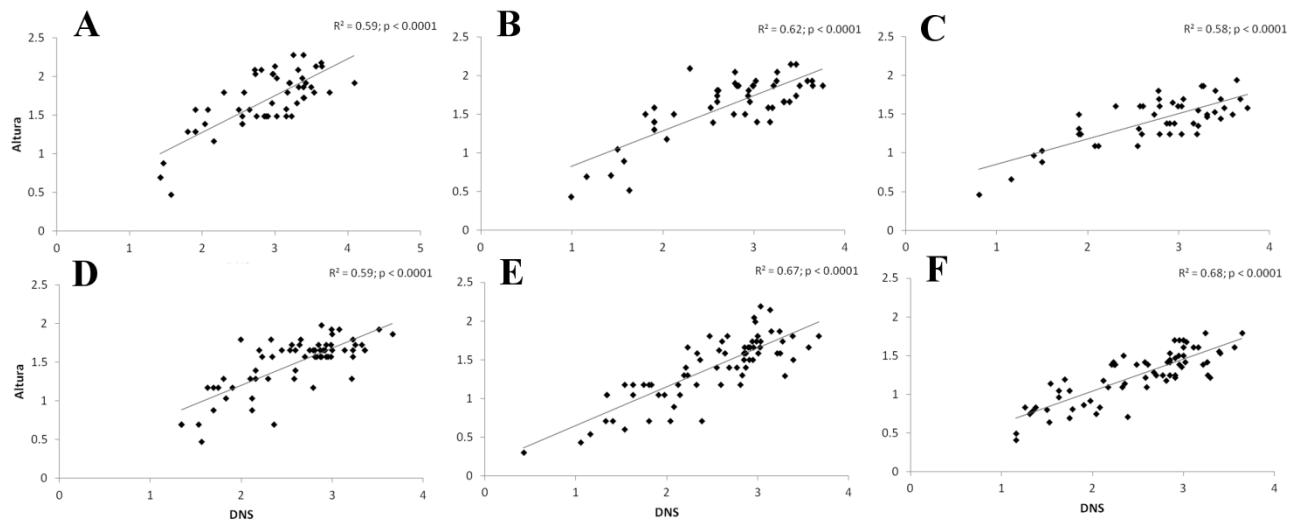


Figura 4. Relação entre diâmetro ao nível do solo (DNS) e a altura da planta para duas populações de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae), localizadas na Área II (A –ano I, B- ano II e C – ano II) e na Área I (D- ano I, E- ano II e F – ano III) em caatinga no município de Parnamirim, PE, BR, durante 3 anos censitários. A linha tracejada indica o ajuste linear entre as variáveis.

**6 FILOGEOGRAFIA DA LEGUMINOSA MADEIREIRA AMEAÇADA DE
EXTINÇÃO *AMBURANA CEARENSIS* (FR. ALLEM.) A.C. SMITH ESTIMADA
COM MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSRN/ SSRCP)**

Elivania Conceição Barral¹, Oswaldo Cruz Neto¹, Laís Angélica de Andrade Pinheiro Borges², Andrea Pedrosa-Harand¹ & Ariadna Valentina Lopes^{1,3}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, Rua Prof. Nelson Chaves s/n, 50372-970, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Universidade Federal da Paraíba, Campus III, Departamento de Ciências Biológicas, Areia, Paraíba, Brasil.

³Autor para correspondência: avflop@ufpe.br

Resumo

Amburana cearensis é uma leguminosa, típica de florestas tropicais sazonalmente secas (SDTFs) que apresenta sua variabilidade genética expressa em inúmeros caracteres, os quais diferem de acordo com seu alcance geográfico. Assim, o objetivo deste trabalho é o estudo filogeográfico para descrever a diversidade genética e os fatores determinantes para a distribuição atual de *A. cearensis*, madeira em perigo de extinção. O estudo está sendo conduzido com marcadores moleculares microssatélites (SSR) nucleares específicos e plastidiais universais para descrição da variabilidade genética a partir de DNA de amostras com origem no Brasil, Argentina e Peru. Os SSR nuclear e plastidiais tem se mostrado promissores e revelado polimorfismo nas populações analisadas. Índices moderados de diversidade gênica (H_E), estruturação genética das populações e alelos exclusivos foram indicados usando os marcadores nucleares. Quatro agrupamentos genéticos foram indicados numa análise Bayesiana e parecem corresponder aos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, onde ocorrem as disjuntas SDTFs nas quais a espécie foi coletada. Com estes dados preliminares é sugerido a expansão da análise com os marcadores plastidiais para construção de uma rede haplotípica, a fim de indicar o centro de distribuição da espécie e como foi dispersa dentro dos domínios fitogeográficos. Em resumo, apesar da ameaça de extinção e ocorrência em áreas com acentuada degradação como a Caatinga, as populações de *A. cearensis* ainda possui diversidade genética suficiente para sua manutenção.

Palavras-chave: *Amburana cearensis*, diversidade genética, florestas tropicais sazonalmente secas (SDTFs), microssatélites nuclear e plastidial

Introdução

Amburana cearensis (Allemão) A.C.Sm é uma leguminosa arbórea de importante valor madeireiro (Bitu *et al.* 2015; ABP Comércio & Importação Ltda 2016) que encontra-se em perigo de extinção, devido ao corte seletivo e ilegal pela comunidade local (Americas Regional Workshop 1998; CNCFlora 2012; IUCN 2016). A espécie tem amplo alcance geográfico no continente sul-americano ocorrendo principalmente no Brasil, sendo registrada também na Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (Leite 2005). Tem alta tolerância a variados habitats sendo encontrada em diferentes tipos de vegetação (Leite 2005; Seleme *et al.* 2015; Flora do Brasil 2018). Atinge seu máximo em áreas de caatinga (Leite 2005) sendo, portanto, um componente florístico de florestas sazonalmente secas (SDTFs) (*sensu* Pennington *et al.* 2009). Seu alcance geográfico coincide com o Arco pleistocênico (Prado & Gibbs 1993; Prado 2000) e no Brasil apresenta distribuição em manchas de SDTFs dentro dos domínios fitogeográfico da Caatinga, Cerrado, Chaco, Mata Atlântica e Pantanal.

Na caatinga, *A. amburana* está amplamente sujeita a perturbação, o que pode levar a perda da sua variabilidade genética expressa em inúmeros caracteres, os quais diferem de acordo com seu alcance geográfico (Leite 2005). A extensão e a forma como está distribuída a variabilidade genética dentro de uma espécie determinam suas chances de sobrevivência e portanto influenciam diretamente estratégias de conservação (Pullin 2002; Holsinger; Newton *et al.* 1999). A filogeografia molecular é uma abordagem poderosa para examinar tais padrões de distribuição da variabilidade genética com o potencial de distinguir aqueles causados por fluxo gênico atual entre as populações, daqueles derivados de eventos históricos (Avice 2000; Hickerson *et al.* 2010). Logo, é importante no manejo de espécies ameaçadas e também como descritores de eventos antigos que envolvem determinado ecossistema (*e.g.* Ribeiro *et al.* 2011) como a caatinga.

A filogeografia continua a crescer em termos de poder e acessibilidade (Chan *et al.* 2011) e o uso de marcadores microssatélites (SSR) para acessar informações sobre a diversidade genética em espécies de plantas (*e.g.* Faleiros 2007; Guichoux *et al.* 2011; Soares *et al.* 2012; Otao *et al.* 2016; Spoladore *et al.* 2016) tem sido cada vez mais frequente e amplamente utilizados em estudos filogeográficos (Marshall *et al.* 2002; Quin Ma *et al.* 2015; Xie *et al.* 2017, Yang *et al.* 2017). Assim, a fim de compreender a diversidade genética e os fatores determinantes para a distribuição atual de *A. cearensis*, uma espécie ameaçada de extinção, está em desenvolvimento um estudo filogeográfico com marcadores SSR nucleares e plastidiais para responder as seguintes perguntas: (a) a diversidade genética está

principalmente dentro ou entre as populações? (b) existe estruturação filogeográfica nas populações de *A. cearensis*? (c) qual o centro de distribuição da espécie e a relação entre as populações nos diferentes domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado, Chaco e Mata Atlântica?

Material e Métodos

Amostragem e extração de DNA

Quinze populações foram amostradas no Brasil e correspondem a coletas realizadas na região Nordeste nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Sergipe, na região Sudeste no Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Tabela 1). Material foliar fora do país foi obtido para um indivíduo da Argentina e outro do Peru. Assim, folhas de um total de 185 indivíduos foram coletadas e acondicionadas em sílica-gel para extração de DNA nuclear e plastidial.

Todo DNA foi obtido por extração em CTAB 2% seguindo protocolo de Doyle & Doyle (1987) adaptado por Ferreira & Grattapaglia (1995). O protocolo utiliza o detergente catiônico CTAB (Brometo de hexadilcetiltrimetilamônio) a 2%, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 1,4 M, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 20mM, PVP (polivinilpirrolidona) a 1% e β -mercaptoetanol a 2%. A quantidade e qualidade do DNA foi avaliada através de gel de agarose a 1%, corado com Gel Red, utilizando marcador de peso molecular conhecido como referência.

Amplificação e genotipagem

Marcadores microsatélites (SSR) espécie específico para *Amburana cearensis* foram desenvolvidos e testados quanto ao polimorfismo por Barral *et al.* (Capítulo 5, em preparação). Oito desses marcadores (Amb_A11, Amb_B7, Amb_C1, Amb_D8, Amb_F6/7, Amb_F8/9-3, Amb_G2/3, Amb_G3/4) foram selecionados quanto ao grau de polimorfismo e foram usados nas reações de amplificação por PCR em termociclador ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Cada reação foi realizada para um volume final de 10 μ L contendo 10 ng DNA, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM cada dNTP, 1 x tampão da Taq com MgCl₂ (10 mM TrisHCl, pH 8,3; 50 mM KCl), 0,5 U/ μ L Taq-polimerase (Invitrogen), 0,156 mM do primer *forward* sintetizado com a sequência nucleotídica universal M13 (cauda M13, Schuelke 2000), 0,625 do primer *reverse*, 0,625 da cauda M13 marcada com fluorescência (6-FAM, VIC, NED e PET) e 1 x TBT-PAR (trealose, albumina de soro bovino e polissorbato-

20). A amplificação dos microssatélites foi realizada de acordo com as seguintes condições para a PCR: 1 ciclo de 94°C por 3 min, 30 ciclos de 30s à 95°C, 30s a Ta (temperatura de anelamento ideal em °C, disponível em Barral *et al.*, capítulo 5 em preparação), 45s a 72°C, 8 ciclos de 30s à 94°C, 45s à 53°C, 45s à 72°C e 1 ciclo de 10 min a 72°C. O DNA amplificado então é checado quanto a qualidade em gel de agarose 3% corado com Gel Red utilizando DNA ladder de 100pb (Invitrogen). Para quantificar o DNA, usou-se um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000).

Genotipagem multiplex foram realizadas a partir da combinação dos produtos da PCR de um mesmo indivíduo para diferentes locos com fluorocromos distintos (DNA mix). As reações continham 1 µL do DNA mix diluídas em 9,75 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e 0,25 µL do DNA ladder GeneScan™ 600 LIZ. Os fragmentos de PCR desses oito microssatélites foram analisados através de eletroforese capilar automatizada ABI3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os alelos foram marcados manualmente usando Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems) e determinados de acordo com o comprimento do motivo com GeneMaker v.2.7 (SoftGenetics). Dez marcadores plastidiais, dentre eles *matK*, *trnL-trnF*, *psbA-trnH* (Hamilton 1999; Taberlet *et al.* 1991) e sete microssatélites plastidiais universais (*emcr74*, *ccmp2*, *ccmp3*, *ccmp4*, *ccmp5*, *ccmp6*, *ccmp7* e *ccmp10*, segundo Weising & Gardner, 1999) foram sequenciados e genotipados, respectivamente, para seleção quanto ao polimorfismo.

Análise dos dados

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o desequilíbrio de ligação para cada população foi testado usando FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001), com ajuste de significância Bonferroni. A presença de alelos nulos foi verificada usando o Micro-verificador (Van Oosterhout *et al.* 2004) e, quando necessário, foi aplicado o método de correção INA no software Freena (Chapius & Estoup 2007). Alelos privados foram identificados usando o programa GenAlEx v.6.5 (Peakall & Smouse 2012).

Diversidade genética dos SSR. Parâmetros de diversidade genética nuclear, incluindo número de alelos (A), heterozigosidade observada e esperada (H_o e H_E), coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram calculados para cada população usando o FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001) e GenAlEx v.6.5 (Peakall & Smouse 2012). O número de alelos privados foi verificado usando GenAlEx v.6.5 (Peakall & Smouse 2012). Medidas de diversidade genética dos microssatélites plastidiais, como número de haplótipos (N_h), número efetivo de haplótipos (N_e), número de haplótipos privados (P) e a diversidade imparcial de haplótipos (H) serão

calculados com cada população usando o programa Arlequin v.3.5. (Excoffier & Lischer 2010).

Estrutura genética populacional e filogeográfica. Estruturação genética populacional foi verificada utilizando estatística F de Wright com auxílio do programa FSTAT (Goudet 2001). Uma análise de agrupamento Bayesiano no BAPS 5.3 (Corander *et al.* 2008) foi utilizada para inferir o número de clusters genéticos nas populações de *A. cearensis* através dos marcadores SSR nucleares. Para descrever a estrutura filogeográfica da variabilidade genética de *Amburana cearensis* será utilizada, em adição aos SSRn, uma rede haplotípica construída a partir do SSRcp. A relação entre os haplótipos será investigada a partir de uma árvore filogenética construída usando modelo median-joining implementado na NETWORK v.4.5 (Bandelt *et al.* 1999). As relações entre os acessos de diferentes populações serão investigadas graficamente através da análise de coordenadas principal (PCoA) na GenALEx v.6.5. Para quantificar a extensão da divergência genética em cada grupo de populações, será realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) no programa Arlequin v.3.5 com base nos locos SSR nucleares. Para inferir as relações entre os clusters de *A. cearensis*, será utilizado DnaSP v.5.10.

Resultados e Discussão

Sequências nucleotídicas obtidas a partir dos marcadores plastídias *matK*, que mostrou dois sítios polimórficos, *trnL-trnF*, monomórfico, e o *psbA-trnH*, para o qual o sequenciamento não funcionou, não se revelaram promissores devido à ausência ou baixo polimorfismo em uma pequena amostra, porém abrangente da distribuição de *A. cearensis*. Portanto, não serão utilizados em futuras análises, fazendo-se sendo necessário o teste de outros marcadores plastidiais para inserir uma escala temporal no estudo filogeográfico. Todavia, os marcadores microssatélites plastidiais universais (SSRcp *sensu* Weising & Gardner 1999) tem amplificado e apresentado polimorfismo nesta mesma subamostra populacional apontando os locos ccmp2, ccmp4 e ccmp7 como bons indicadores da diversidade haplotípica dessa espécie.

Os microssatélites nucleares (SSRn) desenvolvidos para *Amburana cearensis* (Barral *et al.*, em preparação; Capítulo 5 desta tese) exibiram moderado polimorfismo nas populações amostradas e um total de 57 alelos foram detectados em 185 indivíduos genotipados. Além disso, os locos têm segregação independente, e em todas as populações não mostraram associações, ou seja, não há desequilíbrio de ligação ($P = 0,001786$). As estimativas de

diversidade genética mostraram que as populações mantem níveis moderados de diversidade $H_E = 0,5089$ (Tabela 2). Como encontrado por Barral *et al.*, (em preparação; Capítulo 5) a variabilidade genética descritas em riqueza alélica e heterozigosidade tem mantido taxas moderadas no presente estudo, mesmo que para uma abordagem mais ampla da distribuição geográfica previamente estudada.

Apesar de não se ter observado aumentos nos níveis de diversidade, estes ainda sugerem que mesmo sendo uma espécie ameaça típica de SDTFs, como a Caatinga, ambientes com acentuada perturbação (Leite 2005; Pennington *et al.* 2009), ainda há variabilidade possivelmente suficiente para manutenção de suas populações. Em adição, alta variação genética é esperada para espécies que se reproduzem preferencialmente por cruzamentos (alogamia) (Hamrick *et al.* 1979; Hartl & Clark 1997), como *A. cearensis* que possivelmente apresenta um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (Barral *et al.*, em preparação; Capítulo 1).

Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram encontrados nas populações de Pernambuco e do Rio de Janeiro, que apresentaram déficits de heterozigotos, indicados pelo F_{IS} significativo e positivo (Tabela 2). Desvios do EHW também foram observados nos locos Amb_B7 e Amb_G3/4, que apresentam alelos nulos, estes possivelmente contribuindo para o desequilíbrio observado tanto nos locos quanto nas populações (Stoeckel *et al.* 2006, Pollegioni *et al.* 2010; Geng *et al.* 2016). Não apenas alelos nulos, mas outros fatores podem promover desvios do EHW, como rompimentos de cruzamentos panmíticos, alterações na dispersão de diásporos, endogamia, seleção contra heterozigotos e amostragem inapropriada (Stoeckel *et al.* 2006, Geng *et al.* 2016).

Os índices de divergência genética mostraram distinção entre as populações ($F_{ST} = 0,115$), indicando estruturação moderada ($0,051 < F_{ST} < 0,25$, Wright, 1978) (Tabela 3). O F_{ST} reflete o nível de conectividade entre populações (Weir & Cockerham 1984, Rousset 1997) e parece indicar um certo grau de restrição ao fluxo gênico entre as populações estudadas. Ademais, 21 alelos privados foram encontrados nas populações de *A. cearensis* (Tabela 2), dando suporte à restrição ao fluxo gênico atribuindo dessa forma estruturação entre as populações (*e.g.* Vale *et al.* 2011; Gois *et al.* 2014). Alelos exclusivos foram encontrados em maior número nas populações dentro do domínio fitogeográfico da Mata Atlântica ($N = 10$) representadas pelas coletas no Rio de Janeiro, do que nas amostradas na Caatinga ($N = 6$ alelos) e no Cerrado ($N = 5$) (Tabela 2). Em adição, a análise Bayesiana revelou quatro agrupamentos genéticos ($K = 4$) (ver Figura 1), que por comparação quase refletem uma separação de acordo com os domínios fitogeográficos amostrados.

Em resumo, a maior parte da diversidade genética de *Amburana cearensis* encontra-se dentro das populações, indicada pelo F_{ST} moderado. Contudo, ainda é possível observar estruturação genética entre as populações suficiente para indicar quatro agrupamentos genéticos, que na presente análise parece corresponder a distribuição da espécie nos domínios fitogeográficos. Além disso, os índices de diversidade genética como riqueza alélica e heterozigosidade (H_E), sugerem que há variabilidade genética razoável para manutenção de suas populações.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brasil) pela bolsa concedida a E.C. Barral, ao Dr. Toby Pennington da Universidade de Edinburgh pela doação do material botânico da Argentina e Peru, à Tatiane Pereira de Souza e ao Prof. Dr. Marcelo Trindade Nascimento da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) pelo suporte em campo nas coletas realizadas no Rio de Janeiro.

Referências

- Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica). 1998. *Amburana cearensis*. In: IUCN 2007 Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 March 2008.
- Andrade-Lima, D. 1989. *Plantas das Caatingas*. Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography - the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 447pp.
- Burnham, R.J. & Graham, A. 1999. The history of Neotropical vegetation: new developments and status. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86(2): 546-589.
- CNCFlora. *Amburana cearensis* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Amburana cearensis](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Amburana%20cearensis)>. Acesso em 8 março 2017.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13–15.
- Dupanloup I., Schneider, S. & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11:2571–2581.

- Ennos, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant-population. *Heredity* 72: 250-259.
- Excoffier, L.P., Smouse, E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479–491.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN.
- IUCN The Red List of Threatened Species. Version 2016-2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 19 September 2016.
- Leite, E.J. 2005. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr.Allem.) A.C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. *Journal for Nature Conservation* 13: 49-65.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. 2010. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. Serviço Florestal Brasileiro, Brasília/DF.
- Mogni, V.Y., Oakley, L.J. & Prado, D.E. 2015. The distribution of woody legumes in neotropical dry forests: the pleistocene arc theory 20 years on. *Edinburgh Journal of Botany* 72 (1): 35 – 60.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reserch. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pennington, R.T, Lavin, M. & Oliveira, A. 2009. Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 40: 437–457.
- Prado, D.E. 2000. Seasonally dry forests of tropical south America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. *Edinburgh journal of botany* 57: 437-461.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Ribeiro, R.A., Lemos-Filho, J.P., Ramos, A.C.S. & Lovato, M.B. 2011. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46–57.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219–1228.
- 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.

- Seleme, E.P., Lewis, G.P., Stirton, C.H., Sartori, A.L.B. & Mansano, V.F. 2015. A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa* 212 (4): 249–263.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Weising, K. & Gardner, R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in the chloroplast genomes of dicotyledonous plants. *Genome* 42: 9–19.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press.
- Young M.W., Wager-Smith K., Voshall L., Saez L., Myers M.P. 1996. Molecular anatomy of a light-sensitive circadian pacemaker in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 61:279–284.

Lista de tabelas

Tabela 1. Informações sobre a coleta do material botânico. AR, Argentina; BR, Brasil; N, número de amostras; Dom. Fit., domínio fitogeográfico

População	Dom. Fit.	País/Estado	Código	Local de coleta	Latitude (S)	Longitude (O)	N
1	Caatinga	BR/Alagoas	AL1	Piranhas - Fazenda Boa Vista	-9.6196	-37.6944	20
2	Caatinga	BR/Alagoas	AL2	Piranhas - Sítio Poço do Juazeiro	-9.5859	-37.6855	3
3	Cerrado/Caatinga	BR/Bahia	BA1	Morro do Chapéu	-11.4299	-41.3785	16
4	Caatinga	BR/Bahia	BA2	CHESF	-9.3963	-38.2049	2
5	Caatinga	BR/Ceará	CE	RPPN Serra das Almas	-5.1349	-40.8668	24
6	Mata Atlântica	BR/Espírito Santo	ES	Reserva Natural Vale	-19.3909	-40.0715	2
7	Cerrado	BR/Minas Gerais	MG	Buritizeiro	-17.4067	-45.0215	8
8	Caatinga	BR/Paraíba	PB	RPPN Fazenda Almas	-7.4711	-36.8983	16
9	Caatinga	BR/Pernambuco	PE1	Serra Talhada	-7.9919	-38.2983	14
10	Caatinga	BR/Pernambuco	PE2	Parnamirim	-8.1377	-39.5958	18
11	Mata Atlântica	BR/Rio de Janeiro	RJ1	São José de Ubá	-21.2993	-41.8383	21
12	Mata Atlântica	BR/Rio de Janeiro	RJ2	São Francisco de Itabopoana	-21.3349	-41.1575	11
13	Mata Atlântica	BR/Rio de Janeiro	RJ3	Jd. Botânico Rio de Janeiro	-22.9674	-43.225	1
14	Caatinga	BR/Sergipe	SE1	Poço Redondo	-9.7311	-37.8133	15
15	Caatinga	BR/Sergipe	SE2	Canindé São Francisco	-9.6596	-37.7907	16
16	Chaco	AR	AR	Salta	-24.79	-65.41	1
17		PE	PER	Andes			1

Tabela 2. Diversidade genética de populações de *Amburana cearensis* (Fabaceae) baseada em oito locos microssatélites nucleares (SSRn). A, número de alelos por população; A_R , número médio de alelos por loco/população; A_P , alelos privados por população; H_O , heterozigosidade observada; H_E , heterozigosidade esperada; F_{IS} , coeficiente de endogamia

População	A/ A_R	H_O	H_E	F_{IS}	A_P / Loco (pb)
AL	25/3.125	0.4539	0.5661	0.198	0
BA	30/3.75	0.4464	0.5579	0.200	G34(284); F893(220)
CE	25/3.125	0.4979	0.548	0.091	F67(314); B7(269); G23(190, 220)
MG	28/3.75	0.4125	0.5706	0.277	B7(247, 271, 275)
PB	19/2.375	0.3817	0.3677	-0.037	0
PE	26/3.25	0.2741	0.4622	0.407*	A11(212); G23(214)
RJ	35/4.375	0.3745	0.5083	0.263*	D8(162, 166, 176); G34(274); B7(261, 277); G23(208); F893(204, 216, 218)
SE	22/2.75	0.3647	0.4905	0.256	0
Média	26.25/3.31	0.4007	0.5089		

*Diferença significativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg, $p < 0,05$

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética de Weir & Cockerham (1984) em populações naturais de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Smith., localizadas em diferentes estados no seu alcance geográfico no Brasil. F_{IT} = índice de fixação total; F_{ST} = divergência genética entre populações; F_{IS} = índice de fixação dentro das populações.

	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
Média	0.322	0.115	0.236
Desvio-padrão	0.037	0.034	0.057

Figuras

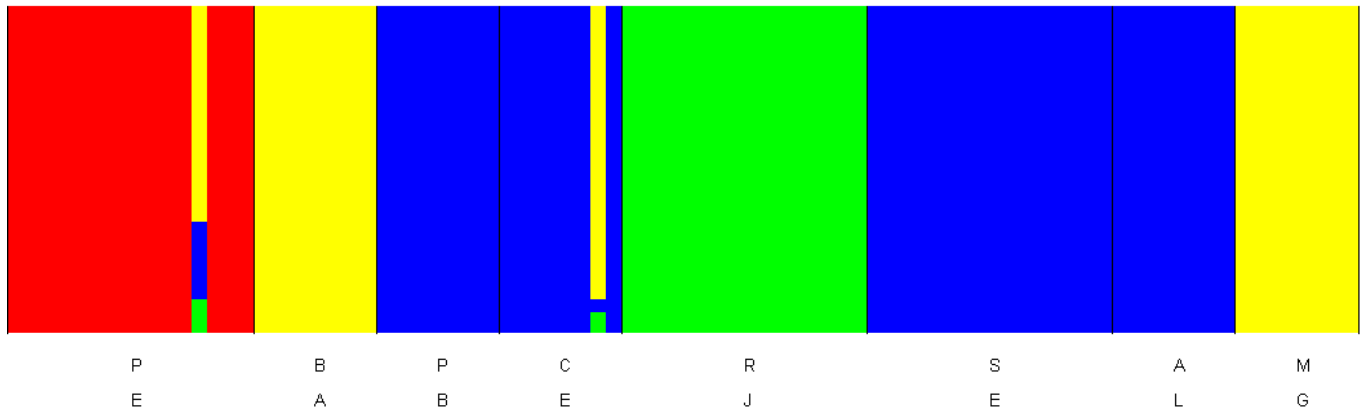


Figura 1. Análise Bayesiana para populações de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. (Fabaceae) amostradas de acordo com sua distribuição geográfica, mostrando quatro agrupamentos genéticos ($K=4$) indicados pela cor vermelha (*Cluster 1*= Pernambuco), amarela (*Cluster 2*= Bahia, Minas Gerais), verde (*Cluster 3*= Rio de Janeiro) e azul (*Cluster 4*= Alagoas, Ceará, Paraíba, Sergipe)

**7 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE EM EXTINÇÃO *AMBURANA CEARENSIS*
(LEGUMINOSAE)**

Elivania Conceição Barral¹, Laís Angélica Borges², Oswaldo Cruz Neto¹, Adna Cristina Barbosa de Sousa³, Liliane Gallindo Dantas^{4,5}, Ana Lucia Gonçalves da Silva⁴, Andrea Pedrosa-Harand⁴, Ariadna Valentina Lopes^{4,6}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, 58397-000, Brasil.

³Departamento de Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brasil.

⁴Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil

⁵Endereço atual: Colegiado Acadêmico de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Senhor do Bonfim, Senhor do Bonfim, Bahia, 48970-000, Brasil.

⁶Autor para correspondência: avflopes@ufpe.br, ariadna.lopes@pq.cnpq.br

Resumo

A espécie *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. pertence à família Leguminosae e ocorre predominantemente em florestas tropicais sazonalmente secas (SDTFs) na América do Sul. Apesar de estar ameaçada de extinção, sua diversidade e estruturação genética não estão sendo consideradas em sua estratégia de conservação. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver marcadores para regiões microssatélites (SSRs) nucleares polimórficas em *A. cearensis*, espécie de importância socioeconômica em SDTFs. No total, 96 clones foram sequenciados a partir de uma biblioteca genômica enriquecida em SSRs da espécie. Dezoito locos apresentaram polimorfismo elevado nas três populações testadas, variando de 5 a 10 alelos por população. A riqueza alélica por loco variou de 2 (Amb_C3-2; Amb_F8/9-1) a 11 (Amb_F8/9-3) alelos. Apenas dois locos mostraram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e coeficiente de endogamia significativo variando de 0,123 a 0,645. As populações mostraram excesso de heterozigotos, desviando do EHW. O nível de estruturação foi moderado ($F_{ST} = 0,126$, $p = 0,001$). Cinco locos amplificaram em espécies de gêneros relacionados, contudo apenas um marcador foi transferível para mais de uma espécie. Os marcadores desenvolvidos se mostraram úteis para estudos genéticos e podem, portanto, subsidiar estratégias de conservação para *A. cearensis*.

Palavras-chave: Caatinga; diversidade genética; polimorfismo, SSR; florestas tropicais sazonalmente secas

Abstract

Amburana cearensis (Allemão) A.C.Sm. belongs to the family Leguminosae and occurs predominantly in South America. Although *A. cearensis* is threatened with extinction, there is no conservation strategy using molecular data for this species, therefore, the aim of this work was to develop markers for polymorphic nuclear microsatellite regions for *A. cearensis*, that has socioeconomic importance and is a component of seasonally dry forests (SDTFs). We sequenced 96 clones from an enriched genomic library of the species. Eighteen loci presented high polymorphism in the three populations tested, ranging from 5 to 10 alleles per population. Allelic richness per locus ranged from 2 (Amb_C3-2; Amb_F8 / 9-1) to 11 (Amb_F8 / 9-3) alleles. Only two loci presented deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and a significant coefficient of inbreeding, ranging from 0.123 to 0.645. Populations showed excess heterozygotes, diverting from HWE. The structuring level was moderate ($F_{ST} = 0.126$, $p = 0.001$). Five loci amplified into species of related genera, but only one marker was transferable to more than one species. The developed markers have proved useful for studies with a genetic approach and may, therefore, support conservation strategies for *A. cearensis*.

Keywords: *Caatinga*; genetic diversity; polymorphism; SSR; seasonally dry tropical forests (SDTF)

Introdução

A espécie *Amburana cearensis* é uma leguminosa arbórea que apresenta distribuição disjunta e exclusivamente sul-americana, ocorrendo predominantemente em florestas tropicais sazonalmente secas do Brasil, como também na Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (Leite 2005; Lima 2015; Seleme *et al.* 2015). O centro de diversificação da espécie é o nordeste brasileiro, região que apresenta a Caatinga como domínio fitogeográfico mais representativo (Leite 2005). A espécie possui propriedades medicinais, potencial madeireiro e para tanoaria, sendo utilizada na medicina popular, na confecção de móveis finos e envelhecimento de cachaças (Rizzini 1978; Leal *et al.* 2005, 2006; Catão *et al.* 2011; Bitu *et al.* 2012). Além da relevância econômica, *A. cearensis* representa uma importante fonte alimentar e abrigo para a entomofauna (Kiill & Lima 2011; Modro *et al.* 2015) e se relaciona com diversas espécies de visitantes florais na Caatinga (Barral *et al.* em prep.). Atualmente, a espécie se encontra ameaçada de extinção (Americas Regional Workshop 1998; IUCN 2016) devido, principalmente, à extração ilegal e insustentável de sua madeira.

Uma estratégia de conservação específica e eficiente que inclua uma base molecular para *A. cearensis* ainda não foi elaborada, apesar do caráter urgente da necessidade de medidas concretas para a preservação da espécie. Aspectos relacionados à sua história de vida, dinâmica da paisagem e diversidade genética devem ser considerados conjuntamente (*e.g.* Wilcock & Neiland 2002; Young *et al.* 2002; Ramirez 2006; González-Varo *et al.* 2009). Estudos prévios com *A. cearensis* tem mostrado mariposas e abelhas como polinizadores efetivos (Kill 2010; Kill & Lima 2011; Barral *et al.* em preparação), dispersão anemocórica de suas sementes que apresentam germinação fanerocotiledonar (Cunha *et al.* 2003; Silva & Rodal 2009; Guedes *et al.* 2010; Loureiro *et al.* 2013) e a cumarina como o principal componente químico ativo do caule (*e.g.* Bravo *et al.* 1999; Canuto & Silveira 2006, 2010; Leal *et al.* 2000). Quanto a taxonomia do gênero, um estudo recente tem sugerido uma nova espécie, *Amburana erythrosperma* E.P. Seleme, C.H. Stirt. & V.F. Mansano, endêmica do sul da Chapada Diamantina, Bahia, BR (Seleme *et al.* 2015). A filogenia mais recente do grupo indica os gêneros africanos *Cordyla* Lour. e *Mildbraediodendron* Harms como grupo irmão de *Amburana* Schwacke & Taub. que, juntamente com os gêneros *Myroxylon* L.f., *Myrocarpus* Allem., *Myrospermum* Jacq., *Dussia* Krug & Urb. e *Petaladenium* Ducke, estes de ocorrência no Brasil, compõem o clado Amburaneae (Cardoso *et al.* 2015).

O uso de ferramentas moleculares, como os marcadores microsatélites (SSR) tem sido cada vez mais frequente para acessar informações sobre o sistema reprodutivo e

diversidade genética em espécies de plantas (*e.g.* Faleiros 2007; Guichoux *et al.* 2011; Soares *et al.* 2012; Otao *et al.* 2016; Spoladore *et al.* 2016). Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) compreendem repetições em *tandem* de 1 a 6 nucleotídeos como motivos de repetição e exibem elevados níveis de variação genética (Tautz 1989; Schlötterer & Pemberton 1998; Tóth *et al.* 2000; Zane *et al.* 2002; Agarwal *et al.* 2008). Encontram-se dispersos no genoma, são codominantes e, por apresentarem alta diversidade alélica, neutralidade e serem abundantes, têm sido usados para avaliar parentesco, sistema reprodutivo, incidência de deriva genética e endogamia, quantificar efeitos da fragmentação de *habitat* sobre a diversidade genética de populações e, portanto, guiar estratégias de conservação de espécies vegetais e animais (Collevatti *et al.* 1999; Heywood & Iriondo 2003; Faleiro 2007; Ganzhorn *et al.* 2015).

Assim, a fim de compreender o sistema de cruzamento, a diversidade genética de *A. cearensis* e adicionar informações genéticas para planos de conservação e manejo mais adequados, foram desenvolvidos e caracterizados marcadores de locos microssatélites espécie-específico, além de testada a transferibilidade para espécies afins.

Material e métodos

Material botânico e extração de DNA

A biblioteca de microssatélites (SSR) foi construída a partir do DNA obtido de folhas jovens coletadas de um indivíduo do município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. A caracterização, baseada em testes de amplificação e polimorfismo dos marcadores SSR, foi realizada com o DNA obtido de folhas armazenadas em sílica gel de trinta indivíduos de *A. cearensis*, coletadas em áreas de ocorrência natural da espécie nos municípios de Serra Talhada (Pernambuco, 10 indivíduos) (7°54'9.42"S, 38°18'5.94"O), Morro do Chapéu (Bahia, 10 indivíduos) (11°25'49"S, 41°22'40.32"O) e Buritizeiro (Minas Gerais, 10 indivíduos) (17°40'40.7"S, 45°02'9.4"O), Brasil. A transferibilidade dos *primers* foi testada em DNA obtido de material botânico herborizado de espécies filogeneticamente afins ao gênero *Amburana* (ver Cardoso *et al.* 2015), cedido pelo Herbário IPA – Dárdano de Andrade-Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA): *Ateleia glazioviana*, *Alexa wachenheimi* Benoist, *Dipteryx lacunifera* Ducke, *Dipteryx odorata* (Aubl.) Forsyth f., *Myrocarpus frondosus* Allem., *Myroxylon peruiferum* L.f., *Swartzia apetala* Raddi, *Swartzia cuspidata* Spruce ex Benth. e *Swartzia simplex* (Sw.) Spreng.. As espécies arbóreas *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, conhecida como óleo vermelho, e *Trischidium molle*

(Benth.) H.E. Ireland foram respectivamente coletadas em área de ocorrência natural na região de Campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro (21°21'10.1"S, 41°14'57.1"O) e no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil, para análise da transferibilidade. O DNA do indivíduo de *A. cearensis* utilizado para a construção da biblioteca de microssatélites foi extraído utilizando o kit de extração de DNA genômico vegetal YGP100 (Real Biotech Corporation). Todo DNA restante foi obtido por extração em CTAB 2% seguindo protocolo de Doyle & Doyle (1987) adaptado por Ferreira & Grattapaglia (1995).

Desenvolvimento dos marcadores SSR

A biblioteca genômica enriquecida foi construída segundo metodologia proposta por Billote (1999). O DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição *AfaI* (antiga *RsaI*, Promega). Os fragmentos então foram ligados a adaptadores *Rsa* 21 (5'-CTCTTGCTTACGCGTGACTA-3') e *Rsa* 25 (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGCAAGAGCACA-3'). Os fragmentos contendo microssatélites foram selecionados por meio de hibridização com sondas (CT)₈ e (GT)₈ ligadas quimicamente à proteína biotina [biotIII (CT)₈ e biotIII (GT)₈] utilizando o Kit Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega). Os fragmentos recuperados foram amplificados via PCR (reação em cadeia da polimerase) e clonados em vetor pGEM-T (Promega). Plasmídeos foram introduzidos em *Escherichia coli* e 96 clones positivos foram selecionados usando β-galactosidase e deixados *overnight* em meio de cultura HM/FM com ampicilina. O DNA dos clones transformados foi extraído através de lise alcalina, purificado e sequenciado usando os primers T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAG - 3') e o Big Dye v.3.1 terminator kit (Applied Biosystems) no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

Amplificação, genotipagem e análise dos dados

As reações de amplificação por PCR foram realizadas em termociclador ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para um volume final de 10 µL por reação contendo 10 ng DNA, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM cada dNTP, 1× tampão da *Taq* (10 mM TrisHCl, pH 8,3; 50 mM KCl), 0,5 U/ul *Taq*-polimerase (Invitrogen), 0,5 mM de cada *primer* e 1× TBT-PAR (trealose, albumina de soro bovino e polissorbato-20). A amplificação dos microssatélites foi realizada de acordo com as seguintes condições para a PCR: 1 ciclo de 94°C por 3 min, 30 ciclos de 30s à 95°C, 30s a Ta (temperatura de anelamento em °C) (Tabela 1), 45s a 72°C e

10 min a 72°C. A temperatura de anelamento foi testada em sistema de gradiente para todos os locos.

Os produtos amplificados foram genotipados em gel de poliacrilamida a 6% em tampão 1× TBE e corados com nitrato de prata 0,2%, segundo Creste *et al.* (2001). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com marcador molecular DNA ladder 10 bp (Invitrogen).

Após genotipagem, a presença de alelos nulos e amplificação preferencial de algum alelo (*drop-out*) foram analisadas com o programa Micro-Checker v2.2 (van Oosterhout *et al.*, 2004). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado por loco e por população utilizando o Genepop 4.1 (Raymond & Rousset 1995). A riqueza (A) e número médio de alelos por loco (A_r), a heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_E) sob as condições do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados para cada loco com o FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado usando o programa Cervus, versão 3.0.7 (Kalinowski *et al.* 2007). A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi analisada com estatísticas F de Wright usando o FSTAT. Além disso, uma análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada por meio do programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

Amplificações em espécies afins

A transferibilidade de todos os microssatélites amplificáveis em *A. cearensis* foi testada em 11 espécies afins (ver Cardoso *et al.* 2015) seguindo protocolos de amplificação descritos acima. Os locos, para os quais pelo menos uma banda evidente foi observada no tamanho esperado foram considerados transferíveis.

Resultados e Discussão

Dos 96 clones selecionados e sequenciados foi possível identificar 19 sequências diferentes com microssatélite, entre di-, tri- e hexanucleotídeos (Tabela 1). Dos 19 pares de *primers* desenhados, 18 amplificaram satisfatoriamente e um total de 90 alelos foram detectados, com amplitude de 2 a 11 e média de 5 alelos/loco. Todos os microssatélites se mostram polimórficos para as populações testadas, indicando que esses locos são úteis para análises de diversidade genética de *A. cearensis*. A heterozigosidade observada (H_o) por loco variou de 0,133 (Amb_B7) a 1,000 (Amb_A11, D6, F8/9-1, H8/9-1) com uma média de 0,761. A heterozigosidade esperada (H_E) por loco variou de 0,315 (Amb_F6/7) a 0,875

(Amb_F8/9-3), com H_E global de 0,573. Riqueza alélica e heterozigosidade são descritores da diversidade genética e apontam que mesmo a população sendo ameaçada, ainda há variabilidade possivelmente suficiente para manutenção de suas populações.

Dentre os marcadores avaliados, apenas dois locos (Amb_B7, Amb_D5) mostraram desvio significativo do equilíbrio de Hardy–Weinberg ($p < 0,05$) (Tabela 1) por déficit de heterozigotos, com F_{IS} positivo e significativo. Alelos nulos foram identificados nos locos Amb_B7, nas populações da Bahia e de Minas Gerais, e Amb_D5, na população de Pernambuco, possivelmente contribuindo para o desequilíbrio observado (Stoeckel *et al.* 2006, Geng *et al.* 2016).

De acordo com o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), indicador da qualidade do marcador molecular em estudos genéticos, 13 marcadores foram considerados muito informativos ($PIC > 0,5$) e 5 mediantemente informativos ($0,25 < PIC \leq 0,5$) *sensu* Botstein *et al.* (1980). O elevado nível de polimorfismo observado indica que os locos desenvolvidos neste trabalho são úteis para a execução de estudos genéticos.

As populações da Bahia, Minas Gerais e Pernambuco apresentaram índices moderados a altos de diversidade gênica (H_E) e desvio do equilíbrio de Hardy–Weinberg ($p < 0,05$), com valores negativos do índice F_{IS} (Tabela 2). Tais valores negativos do índice F_{IS} indicam ausência de endogamia, de forma que o nível de endogamia real não excede o nível esperado se os acasalamentos fossem ao acaso. Em adição, diferentes características podem contribuir para F_{IS} negativo, como seleção contra homozigotos, propagação assexuada (clonal) e sistema reprodutivo autoincompatível (Stoeckel *et al.* 2006), este último possivelmente presente na espécie foco deste estudo (Barral *et al.* em preparação, cap. 1)

O grau de diferenciação entre as populações foi estimado pelas medidas de F_{ST} par-a-par (Tabela 2), que indicou estruturação genética moderada de 0,126 ($0,05 < F_{ST} \leq 0,25$, Wright, 1978). Estruturação genética foi estimada pelas medidas de F_{ST} usando estatística F de Wright ($F_{ST} = 0,126$, $p = 0,001$) e por meio da AMOVA ($F_{ST} = 0,0972$, $p < 0,001$) sugerindo estruturação moderada entre as populações. O F_{ST} reflete o nível de conectividade e os padrões de fluxo gênico entre populações (Weir & Cockerham 1984; Rousset 1997) e parece indicar um certo grau de restrição ao fluxo gênico entre as populações estudadas.

Os testes de transferibilidade mostraram que poucos locos amplificaram em espécies afins (ver Tabela 3), o que reflete a alta especificidade destes novos microssatélites. Dentre os cinco marcadores transferíveis (Amb_A9, Amb_B7, Amb_C3-1, Amb_C12, Amb_D5), apenas o loco Amb_D5 amplificou para 10 de 13 espécies filogeneticamente relacionadas à *A. cearensis*. Os demais locos amplificaram em 1-2 espécies. Segundo Barbara *et al.* (2007) a

transferibilidade entre diferentes espécies podem ser resultado de amplas radiações adaptativas e baixos níveis de divergência nas sequências de DNA nas espécies testadas. A maioria das taxas de transferibilidade foram de 5,5% sugerindo certo grau de divergência entre *A. cearensis* e as demais espécies. Contudo, a taxa de transferência de 22,2% para *Myrocarpus frondosus* dá suporte a filogenia de Cardoso *et al.* 2015 colocando esta espécie e *A. cearensis* num mesmo clado, o clado Amburaneae.

Os 18 locos microssatélites polimórficos aqui descritos para *Amburana cearenses* serão bastante úteis para análises filogeográficas e reprodutivas na espécie. Além disso, a transferibilidade de alguns locos para espécies relativamente distantes sugere que os mesmos também poderão ser úteis para estudos similares em espécies filogeneticamente mais relacionadas.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brasil) pela bolsa concedida a E.C. Barral, ao Herbário IPA – Dárdano de Andrade-Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA, Brasil) pela doação do material botânico herborizado.

Referências

- Agarwal M., Shrivastava N. & Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27:617–631.
- Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica). 1998. *Amburana cearensis*. In: IUCN 2007 Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 March 2008.
- Barbara, T., Palma-Silva, C., Paggi, G.M., Bered, F., Fay, M.F. & Lexer, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16: 3759–3767.
- Billotte, N., Lagoda, P., Risterucci, A. & Baurens, F. 1999. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288.
- Bitu, V.C.N., Bitu, V.C.N., Matias, E.F.F., Lima, W.P., Portelo, A.C., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A. 2015. Ethnopharmacological study of plants sold for

- therapeutic purposes in public Markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 172: 265–272.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, H. & Davis, W.R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Bravo, J.A., Sauvain, M., Gimenez, A., Munoz, V.O., Callapa, J. Le Menolievier, L., Massiot, G. & Lavand, C. 1999. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*. 50:71-74.
- Canuto, K.M. & Silveira, E.R. 2006 Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. *Química Nova*. 29: 1241-1243.
- Canuto, K.M. & Silveira, E.R. 2010. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). *Química Nova* 33(3): 662-666.
- Catão, C. G., Paes, J. B., Gomes, J. P. & Araújo, G. T. 2011. Qualidade da madeira de cinco espécies florestais para o envelhecimento da cachaça. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 15(7): 741–747.
- Collevatti, R.G., Brondani, R.V. & Grattapaglia, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity* 83: 748-756.
- Creste S., Tulmann, N.A. & Figueira, A. 2001. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306.
- Cunha, M.C.L. & Ferreira, R.A. 2003. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith - Cumaru – Leguminosae Papilionoideae. *Revista Brasileira de Sementes* 25(2): 89-96.
- Faleiro, F. G. 2007. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 102p.
- Ganzhorn, S. M., Perez-Sweeney, B., Thomas, W. W., Gaiotto, F. A. & Lewis, J. D. 2015. Effects of fragmentation on density and population genetics of a threatened tree species in a biodiversity hotspot. *Endangered Species Research* 26: 189–199.
- Geng, QF., Yang, J., He, J., Wang, DB., Shi, E., Xu, WX., Jeelani, N., Wang, ZS. & Liu, H. 2016. Microsatellite markers for the critically endangered elm species *Ulmus gaussenii* (Ulmaceae). *Genes Genetic Systems* 91(1): 11-14.

- González-Varo, J.P., Arroyo, J. & Aparicio, A. 2009. Effects of fragmentation on pollinator assemblage, pollen limitation and seed production of Mediterranean myrtle (*Myrtus communis*). *Biological Conservation* 142: 1058–1065.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3.2. Lausanne University, Lausanne, Switzerland. Available: <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Accessed 2014 Jan 07.
- Guedes, R.S., Alves, E.U., Gonçalves, E.P., Viana, J.S., França, P.R.C. & Lima, C.R. 2010. Umedecimento do substrato e temperatura na germinação e vigor de sementes de *Amburana cearensis* (All.) A.C. Smith. *Revista Brasileira de Sementes* 32(3): 116-122.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, O., Légar, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F. & Petit R.J. 2011. Current trends in microsatellites genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591 – 611.
- Heywood, V.H. & Iriondo, J.M. 2003. Plant conservation: Old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113: 321-335.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099–1106.
- Kiill, L.H.P. 2010. Plantas da Caatinga ameaçadas de extinção e sua associação com polinizadores. In: *Semana dos Polinizadores*, 2. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010.
- Kiill, L.H.P. & Lima, P.C.F. 2011. Plano de manejo para espécies da caatinga ameaçadas extinção na reserva legal do projeto salitre. Petrolina. Embrapa Semiárido.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H. & Anderss, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* 21(5): 1111-1115.
- Leal, L.K.A.M., Ferreira, A.A.G., Bezerra, G.A., Matos, F.J.A., & Viana, G.S.B. 2000. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 151–159.
- Li, YC., 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.
- Loureiro, M.B., Teles, C.A.S., Virgens, I.O., de Araújo, B.R.N., Fernandez, L.G. & de Castro, R.D. 2013. Aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de sementes e plântulas de

- Amburana cearensis* (FR. ALL.) A.C. Smith (Leguminosae - Papilionoideae). *Revista Árvore* 37(4) 679-689.
- Modro A.F.H., Biazatti, S.C., Dalazen, A.P., Ferronato, M.L. & Maia, E. 2015. Espécies florestais com potencial apícola utilizadas para recuperação de áreas degradadas na zona da mata rondoniense. *Cadernos de Agroecologia* 10(3):.
- Otao, T., Kobayashi, T. & Uehara, K. 2016. Development and characterization of 14 microsatellite markers for *Indigofera pseudotinctoria* (Fabaceae). *Applications in Plant Sciences* 4(4): 1500110.
- Palmieri, D.A., Bechara, M.D., Curi, R.A., Gimenes, M.A. & Lopes, C.R. 2005. Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae* (*Arachis*, Fabaceae). *Molecular Ecology Notes* 5: 77–79.
- Ramirez, N. 2006. Reproductive biology and plant species selection for habitat restoration in the Venezuelan Gran Sabana Palteau. *Interciencia*, 31(5): 330-337.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP: Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* 86(3): 248-249.
- Rizzini, C.T. 1978. Árvores e madeiras úteis do Brasil. Editora Edgar Blücher LTDA. São Paulo.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 465–486
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219–1228.
- Schlötterer, C. & Pemberton J. 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: DeSalle, R. & Schierwater, B. (eds) *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Birkhäuser Verlag Basel, pp. 71-86.
- Seleme, E.P., Lewis, G.P., Stirton, C.H., Sartori, A.L.B. & Mansano, V.F. 2015. A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa* 212 (4): 249–263.
- Silva, M.C.N.A. & Rodal, M.J.N. 2009. Padrões das síndromes de dispersão de plantas em áreas com diferentes graus de pluviosidade, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23(4): 1040-1047.
- Soares, T.N., Melo, D.B., Resende, L.V., Vianello, R.P., Chaves, L.J., Collevatti, R.G. & Telles, M.P.C. 2012. Development of microsatellite markers for the neotropical tree

- species *Dipteryx alata* (Fabaceae). American Journal of Botany: Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences e72–e73.
- Spoladore, J., Mansano, V.F., Freitas, L.C.D., Sebbenn, A.M. & Lemes, M.R. 2016. DNA microsatellite markers for *Swartzia glazioviana* (Fabaceae), a threatened species from the Brazilian Atlantic forest. Applications in Plant Sciences 4(2): 1500081
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research 6463-6471.
- Tóth, G., Gáspári, Z. & Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Research 10: 967-981.
- van Oosterhout C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4(3):535-538.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358–1370.
- Wilcock, C. & Neiland, R. 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. Trends in Plant Science 7(6): 270-277.
- Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among natural populations. University of Chicago Press.
- Young, A.G., Hill, J.H., Murray, B.G. & Peakall R. 2002. Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the subalpine forb *Rutidosia leiolepis* F. Muell. (Asteraceae). Biological Conservation 106: 71–78.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1-16.

Lista de tabelas

Tabela 1. Características de 19 pares de *primers* de locos microssatélites desenvolvidos para *Amburana cearensis*. Ta: temperatura de anelamento; F: variação no tamanho dos alelos; A: número de alelos; Ar: média do número de alelos por loco; H_O= heterozigosidade observada; H_E= heterozigosidade esperada; F_{IS}= coeficiente de endogamia

Loco	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Motivo	Ta (°C)	F (bp)	A/Ar	H _O	H _E	F _{IS}	PIC
Amb_A7	F: AGGATATGAACTTCCATTGGGC R: TCTTTTGTGCGCAAAGGCC	(AC) ₉	58	217/0	-	-	-	-	-
Amb_A9	F(5): CCACTTGTCCATCCAGCGTGAA R(1): AGACCACGTATAAGGAGGGTC	(AC) ₈	60	256-262	4/3.41	0.567	0.454	-0.249	0.519
Amb_A11	F(2): AGGGTGATTTTCCCCGTATGG R(5): CGTAGCATGTCATAGCCGAGGG	(AC) ₁₃	60	182-227	6/4.01	1.000	0.623	-0.610	0.641
Amb_B7	F(1): TGGTCTAGGTTGCATGGACACG R(3): TGTCAAGCTTAGTTGTGGCAGG	(TG) ₁₀ (TA) ₈	58	230-246	6/3.82	0.133	0.376	0.645*	0.386
Amb_C1	F(1): ACACCGAGAAAGACGGCCACAG R(1): AAGTCCACGTCCCAGGCAACG	(TC) ₁₁	64	222-228	4/3.91	0.467	0.483	0.034	0.651
Amb_C3-1	F(1): ACCACCAAGATTCAGCTCCCC R(1): TGCAGCACTATTCACCTCACCGA	(AG) ₇	56	190-198	3/2.46	0.700	0.470	-0.488	0.407
Amb_C3-2	F(1): GAGATATTCTCTTCGGTGAGTG R(7): ACTAATGCCAAATCTAAGGCGG	(TG) ₇	56	172-184	2/2.0	0.967	0.500	-0.933	0.375
Amb_C12	F(1): ACACTCTCCATCTCTGCCACAC R(1): TGGCATTCACTTGCCACCAAG	(AT) ₄ (GT) ₈	58	204-223	3/2.99	0.967	0.641	-0.509	0.575
Amb_D5	F(5): AGAATGATCTATTGCAACTCGG R(4): TGGACAAATATGAGTGCACCTC	(AC) ₇	56	217-222	4/3.85	0.500	0.570	0.123*	0.664
Amb_D6	F(1): AGACGGCATCAAACCGGACTGC	(CTTT) ₃	64	170-223	3/2.95	1.000	0.574	-0.740	0.563

Amb_D8	R(1): ACACGTGACAAGCGGTAGTGC								
	F(1): AGCAAGCGCTTAGCTTGGGTC	(AC) ₁₀	62	138-165	10/6.84	0.833	0.728	-0.145	0.775
Amb_F6/7	R(11): ACGAAAAATGCAGCCGGGAAC								
	F: ACCAAATTGGATACCTACTGCC	(CT) ₁₃	60	290-324	6/3.26	0.367	0.315	-0.165	0.310
Amb_F8/9-1	R: AGAAAAATGTGAACCGGCAAGC								
	F: TCTACACAGGATGCCCCAAATG	(CAAAAA) ₃	54	208-211	2/2.0	1.000	0.500	-	0.375
Amb_F8/9-2	R: TGACCATCCTAACCCCAAGGGT								
	F: AGTTGAGACCTGAGGGACC	(TCC) ₄	60	203-230	3/2.64	0.967	0.547	-0.762	0.519
Amb_F8/9-3	R: GTGGACATATAGCAGCGCAGAG								
	F: CACCACAAATATGCAGCATCCC	(GA) ₁₀	60	182-209	11/7.32	0.793	0.875	0.096	0.448
Amb_G2/3	R: AGGAATTTGTAACCAACCCCG								
	F: TTTTGGTCGGGAGGGCAC	(TG) ₉	56	187-216	8/5.44	0.675	0.648	-0.051	0.690
Amb_G3/4	R: ATTGGGTTTAGCGTTGGGCCG								
	F: AGGCAACTCTAGCCCATGCAC	(GT) ₁₄ (GA) ₁₁	64	257-271	7/5.67	0.930	0.760	-0.220	0.774
Amb_H5/6	R: TGTGGTGA CTGATGGACATGCT								
	F: TCGTCGGATTCACAGCCTCCTG	(AC) ₁₀	62	242-250	4/3.80	0.833	0.644	-0.293	0.615
Amb_H8/9-1	R: CGAGCTATGCTCTTGCATGGGA								
	F: TGGTTCAAAGATGTGCATCCCG	(AAAAAT) ₃	56	230-233	4/3.19	1.000	0.604	-0.656	0.538
	R: TATTTGCACAGATGGCCTCCG								
Média					5/3.86	0.761	0.573	-0.3705	0.5675

*Desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, $p < 0,05$

Tabela 2. Diversidade e estruturação genética para uma subamostra de 30 indivíduos (N= 10 por população) de três populações de *Amburana cearensis*. A= riqueza alélica; F_{IS} = índice de fixação; H_O/H_E = heterozigosidade observada/esperada; F_{ST} = coeficiente de diferenciação.

População	A	H_O	H_E	F_{IS}	F_{ST}	*Des
Bahia	72	0,806	0,611	-0,327*	-	vio
Minas Gerais	71	0,694	0,573	-0,243*	-	signi
Pernambuco 1	51	0,744	0,534	-0,421*	-	ficati
Bahia x Pernambuco	-	-	-	-	0,144	vo
Bahia x Minas	-	-	-	-	0,0713	do
Minas x Pernambuco	-	-	-	-	0,1272	equil
						íbrio
						de

Hardy-Weinberg, $p < 0,05$

8 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nesta tese pode-se identificar as estratégias reprodutivas de *Amburana cearensis*, classificando-a como uma espécie potencialmente alógama, com possível sistema de cruzamento autoincompatível de ação tardia, dependente de vetores de polinização para reprodução. Além disso, a espécie apresenta um sistema de polinização misto adaptado às mariposas, que mostraram relação com o forte odor adocicado, mas que permite a ação de outros agentes polinizadores que podem contribuir para o aumento do sucesso reprodutivo. Ainda nesta tese, foi observado que populações de *A. cearensis* apresentam estrutura populacional diamétrica seguindo uma distribuição exponencial negativa (em forma de “J-invertido”) típicas de populações autorregenerativas. Diferenças na densidade populacional, na estatura dos indivíduos e na distribuição espacial foram observadas nas áreas estudadas e parecem estar relacionadas ao tipo de solo, recursos limitantes como a água e a perturbação antrópica. Em relação ao estudo filogeográfico, os dados preliminares têm fornecido informações importantes quanto a diversidade genética de *A. cearensis*, indicando que possivelmente ainda há variabilidade genética suficiente para manutenção da espécie. Assim, o presente trabalho ampliou o panorama de informações quanto a autoecologia de *A. cearensis* desde sua biologia reprodutiva, ecologia de populações e atributos genéticos que podem ser usados em estratégias conservacionistas e planos de manejo para o uso racional desta leguminosa típica de caatinga que encontra-se em perigo de extinção.

REFERÊNCIAS

- AVISE, J.C. Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge, MA: Harvard University Press. 2000. Disponível em: http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=1A7YWH4M8FUC&oi=fnd&pg=PA1&dq=phylogeography&ots=LvtP27mOaQ&sig=Hwppf0A7MZ_4U4fGSYKW_pbGg6I#v=onepage&q=phylogeography&f=false. (Acesso em 12 Setembro 2012).
- AMERICAS REGIONAL WORKSHOP (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica). 1998. *Amburana cearensis*. In: IUCN 2007 Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. (Acesso em 27 Maio 2008).
- AMORIM, I.; SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.L. Flora e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 19(3): 615-623, 2005.
- ANDRADE-LIMA, D. Plantas das Caatingas. Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro, 1989.
- ARANGO, H.G. Bioestatística – Teórica e Computacional. Editora Guanabara Koogan, 2ª Ed.. Rio de Janeiro/RJ, 2005.
- BANDELT, H-J.; FORSTER, P. & RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48., 1999.
- BENTON, T.G.; GRANT, A. Elasticity analysis as an important tool in evolutionary and population ecology. *Tree* 14(12): 467-471, 1999.
- BEMINGHAM, E. & MORITZ, C. Comparative phylogeography: concepts and applications *Molecular Ecology* 7: 367-369, 1998.
- BULLOCK, S.L.; NICOL, A.; GROSS, S.P.; ZICHA, D. Guidance of bidirectional motor complexes by mRNA cargoes through control of dynein number and activity. *Current Biology* 16(14): 1447-1452, 2006.
- CAVALLI, S.S. & WINGE, H. Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS, L.B., BERED, F. (orgs). *Genética e Evolução Vegetal*. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2003.
- CRESTE S.; TULMANN NETO A.; FIGUEIRA A. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306, 2001.
- CUNHA, M.C.L.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith -Cumaru – Leguminosae Papilionoideae. *Revista Brasileira de Sementes* 25(2): 89-96, 2003.
- DAFNI, A.; KEVAN, P.G.; HUSBAND, B.C. *Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Ontario, 2005.

EL MOUSADIK A.; PETIT R.J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832–839, 1996.

FANTINI, A.; REIS, A.; GUERRA, M.P. Sustained yield management in tropical Forest: A proposal based on the autoecology of the species. *Sellowia* 42(1): 25-33, 1992.

FAEGRI, K.; PIJL, VAN DER. L. The principles of pollination ecology. Oxford. Pergamon Press, 1979.

FONSECA, M.G.; MARTINI, A.M.Z.; SANTOS, F.A.M. Spatial structure of *Aspidosperma polyneuron* in two semi-deciduous forests in Southeast Brazil. *Journal of Vegetation Science* 15: 41-48, 2004.

FREITAS, L.B. História evolutiva das espécies de *Passiflora* L. de ocorrência no Rio Grande do Sul: aspectos genéticos, estrutura populacional e filogenia. *Revista Brasileira de Biociências* 9(1): 41-47, 2011.

GOUDET, J. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices, Version 2.9.3.2. Disponível em: <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html> (Acesso em Fevereiro 2012), 2001.

GUREVITCH, J.; SCHEINER, S.M.; FOX, G.A. *Ecologia Vegetal*. 2 Ed. Porto Alegre: Artmed. 592p, 2009.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. *Principles of Population Genetics* 3ª Ed. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, 1997.

JUSTINIANO, M.J.; FREDERICKSEN, T.S. Phenology of tree species in Bolivian dry forests. *Biotropica* 32(2): 276-281, 2000.

KEARNS, C.A.; INOUE, D.W. *Techniques for Pollination Biologists*. University Press of Colorado, 1993.

KIILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F. Plano de manejo para espécies da caatinga ameaçadas extinção na reserva legal do projeto salitre. Petrolina. Embrapa Semiárido, 2011.

LEAL, L.K.A.M.; NOBRE JÚNIOR, H.V.; CUNHA, G.M.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; OLIVEIRA, R.A.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; VIANA, G.S.B. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neuroscience Letters* 388: 86-90, 2005.

LEAL, L.K.M.; COSTA, M.F.; PITOMBEIRA, M.; BARROSO, V.M.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; VIANA, G.S.B. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. *Life Science* 79(1): 98-104, 2006.

LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr.Allem.) A.C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. *Journal for Nature Conservation* 13: 49-65, 2005.

LIMA, H.C. *Amburana* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em : <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB022779>. (Acesso em 12/09/2012).

LÓPEZ, J. A. Árboles comunes del Paraguay. Ñande Yvira´ Mata Kuera, Cuerpo de Paz, Asunción, 1987.

LOEW, S.S. Role of Genetics in Conservation Biology. In: Ferson, S., Burgman, M. (Eds.): Quantitative Methods for Conservation Biology. Springer-Verlag, Nova York. 322 pp., 2000.

MACHADO, I.C.; LOPES, A.V. Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. *Annals of Botany* 94: 365-376, 2004.

MACHADO, I.C.; BARROS, L.M.; SAMPAIO, E.V.S.B. Phenology of caatinga species at Serra Talhada – PE, Northeastern Brazil. *Biotropica* 29(1): 57-68, 1997.

MANNI, F.; GUÉRARD, E.; HEYER, E. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* 76: 173–190, 2004.

MILTON, S.J.; RYAN, P.G.; MOLONEY, C.L.; COOPER, J.; DEAN, W.R.J.; MEDEIROS JR. A.C. Disturbance and demography of *Phylica arborea* (Rhamnaceae) on the Tristan-Gough group of islands. *Botanical Journal of the Linnean Society* 111(1): 55–70, 1993.

MORELLATO, L.P.C. As estações do ano na floresta. In: P.C. MORELLATO; LEITÃO-FILHO, H.F. (orgs). *Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana* Editora da Unicamp, Campinas, p. 37-41, 1995.

MORISITA, M. Id--index, a measure of dispersion of individuals. *Res. Popul. Ecol.* 4: 1-7, 1962.

NEWSTROM, L.E.; FRANKIE, G.W.; BAKER, H.G. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26: 141-159, 1994.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295, 2006.

PEREIRA, I.M.; ANDRADE, L.A.; BARBOSA, M.R.V.; SAMPAIO, E.V.S.B. Composição florística e análise fitossociológica do componente arbustivo-arbóreo de um remanescente florestal no agreste paraibano. *Acta Botanica Brasilica* 16(3): 357-369, 2002.

POOLE, R.W. An introduction to quantitative ecology. New York: McGraw-Hill, 1994.

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

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals Missouri Botanical Garden* 80: 902–927, 1993.

PULLIN, A.S. Conservation Biology. Cambridge University Press. Cambridge, 2002.

QUEIROZ, L.P. Leguminosas da Caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana. Royal Botanic Gardens, Kew and Associação Plantas do Nordeste, 2009.

QUESADA, M.; STONER, K.E.; LOBO, J.A.; HERRERÍAS-DIEGO, Y.; GUEVARA, C.P.; MUNGUÍA-ROSAS, M.A.; SALAZAR, K.A.O.; GUERRERO, V.R. Effects of forest fragmentation on pollinator activity and consequences for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated Bombacaceous trees. *Biotropica* 36(2): 131-138, 2004.

RAMIREZ, N. Biología reproductiva y selección de especies nativas para la recuperación de áreas degradadas: métodos y significado. *Acta Botanica Venezuelana* 20(1): 43-66, 1997.

RAMIREZ, N. Reproductive biology and plant species selection for habitat restoration in the Venezuelan Gran Sabana Palteau. *Interciencia*, 31(5): 330-337, 2006.

RAMIREZ, N.; ARROYO, M.K. Estructura Poblacional de *Copaifera pubiflora* Benth. (Leguminosae; Caesalpinioideae) en los Altos Llanos Centrales de Venezuela *Biotropica* 22(2): 124-132, 1990.

RAMOS, K.M.O.; FELFILI, J.M.; FAGG, C.W.; SOUSA-SILVA, J.C.; FRANCO, A.C. Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. *Acta Botânica Brasílica* 18(2): 351-358, 2004.

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

RIZZINI, C.T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. Editora Edgar Blücher LTDA. São Paulo, 1978.

ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F -Statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228, 1997.

SAMPAIO, E.V.S.B. Caracterização do bioma Caatinga: Características e potencialidades. Pp 39-48. In: GARIGLIO, M.A., SAMPAIO, E.V.S.B., CESTARO, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. (eds.). Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. Brasília/DF, Serviço Florestal Brasileiro, 2010.

SANTOS, F.A.M. Ecologia de populações de plantas – região sudeste do Brasil. Pp. 143-146. In: ARAÚJO, E.L. MOURA, A.N., SAMPAIO, E.V.S.B., GESTINARI, L.M.S.; CARNEIRO J.M.T. (eds.). Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil. UFRPE, Recife, 2002.

SILVA, M.C.N.A.; RODAL, M.J.N. Padrões das síndromes de dispersão de plantas em áreas com diferentes graus de pluviosidade, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 23(4): 1040-1047, 2009.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F.J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3a Ed. W. H. Freeman and Co.: New York, 1995.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamos nativa e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª Ed. Instituto Plantarum. Nova Odessa, 2008.

STEBBINS, G.L. Self-fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist* 91: 337-354, 1957.

TSUDA, Y; IDE, Y. Wide-range analysis of genetic structure of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan. *Molecular Ecology* 14: 3929-3941, 2005.

WHITMORE, T.C. Tropical forest disturbance, disappearance, and species loss. *In*: LAURANCE, W.F.; BIERREGAARD, R.O. (eds.). Tropical forest remnants, ecology, management, and conservation of fragmented communities. Chicago: University of Chicago Press, 1997.

WEISING K.; GARDNER R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in the chloroplast genomes of dicotyledonous plants. *Genome* 42: 9–19, 1999.

ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PLANT BIOLOGY

AUTHOR GUIDELINES

Supporting Information: Authors are encouraged to provide additional materials as Supporting Information that will be accessible online. Please identify the Supporting Information as such and include appropriate figure and table captions at the end of the manuscript.

Editorial Policy

Plant Biology publishes research results from all fields of plant science. Manuscripts must be of general interest, not only addressed to a specialized readership. The journal encourages publications with an interdisciplinary approach.

Plant Biology accepts

1. Problem-oriented original research papers (maximum 9000 words)
2. Problem-oriented short research papers (maximum five typeset pages)
3. Concise review articles
4. Acute views, i.e., comments on actual problems and provocative opinion articles.

Purely descriptive papers will not be accepted. The Editors welcome contributions from all over the world.

Effective with the 2015 volume, this journal will be published in an online-only format. Print subscription and single issue sales are available from Wiley's Print-on-Demand Partner. To order online click through to the ordering portal from the journal's subscribe and renew page on Wiley Online Library.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:
 <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1438-8677/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1438-8677/homepage/ForAuthors.html)>

ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PHYTOCHEMISTRY

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Phytochemistry invites research articles on all aspects of pure and applied plant chemistry, plant biochemistry, plant molecular biology and chemical ecology. The Journal is currently divided up into the following sections:

Editorial Comment, Molecules of Interest, Review Articles, Structural Elucidation and Full Papers. Editorial Comment will be an occasional series where Regional Editors, Board Members or other scientists will be invited to comment on phytochemistry topics of global interest and debate.

Molecules of Interest will consist of invited short reviews (3-4) printed pages of individual compounds or macromolecules of plant, fungal or algal origin. These can be novel compounds or newly discovered properties of familiar compounds. Please contact Dr Richard J Robins if you wish to prepare a Molecules of Interest paper.

Review Articles are published at regular intervals, ranging in scope from primary metabolism and regulation of plant growth, through plant enzymology to natural product chemistry and the biological activity of plant products. They deal with significant new areas of research and are intended to command the interest of the general reader. Authors should consult their Regional Editors with an outline of their proposed Review before preparing such articles. Published Reviews include a biography and picture of each author.

Structure Elucidation papers, accepted as full papers in the Chemistry section, should include either a substantial description of several new compounds without any conclusion as to their significance, or a description of the study of new compounds with expected structures incorporating conclusions.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:
<https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/273?generatepdf=true>

ANEXO C – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO BIOLOGICAL CONSERVATION

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Please read all information carefully and follow the instructions in detail when preparing your manuscript. Manuscripts that are not prepared according to our guidelines will be sent back to authors without review. Biological Conservation encourages the submission of high-quality manuscripts that advance the science and practice of conservation, or which demonstrate the application of conservation principles for natural resource management and policy. Given the broad international readership of the journal, published articles should have global relevance in terms of the topics or issues addressed, and thus demonstrate applications for conservation or resource management beyond the specific system or species studied.

Types of paper

Word counts include text, references, figures and tables. Each figure or table should be considered equal to 300 words.

1. Full length articles (Research papers) Research papers report the results of original research. The material must not have been previously published elsewhere. Full length articles are usually up to 8,000 words.
2. Review articles Reviews should address topics or issues of current interest. They may be submitted or invited. Review articles are usually up to 12,000 words and must include a Methods section explaining how the literature for review was selected.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:
<<https://www.elsevier.com/journals/biological-conservation/0006-3207?generatepdf=true>>

ANEXO D - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO MOLECULAR ECOLOGY

AUTHOR GUIDELINES

General information

Molecular Ecology publishes papers that use molecular genetic techniques to address consequential questions in ecology, evolution, behaviour and conservation. Studies may employ neutral markers for inference about ecological and evolutionary processes, or examine ecologically important genes and their products. Molecular Ecology concentrates on primary research articles (i.e., Original Articles and 'From the Cover' Papers) but operates a flexible policy regarding other submissions, including Reviews, Syntheses, Opinions, Comments and Meeting Reviews. We also publish articles on technical methods, computer programs and genomic resource development in our companion journal, Molecular Ecology Resources. However, papers that are primarily descriptive and relevant only to the taxon being studied should be submitted to a more specialized journal. We typically provide an editorial decision on new submissions within 4 to 8 weeks. Papers usually appear on Accepted Articles (with a DOI assigned) within days after receipt of the final manuscript, and normally appear on Early View within about a month. There are no page charges associated with publication in Molecular Ecology.

Article Types

Molecular Ecology will consider several types of articles. Original Articles. Our principal function is to publish primary research papers. Such papers are reports of research projects that are complete to the extent that they yield valuable insights into topics within our coverage. About 90% of all papers we publish are in this category. Original Articles have a limit of 8000 words per paper, excluding references, although exceptions may be granted in some cases. They generally contain a Title Page, an Abstract (≤ 250 words), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, brief Acknowledgements, References, Data Accessibility, Author Contributions, Tables and Figures (with captions), in this order. We generally prefer that they have separate Results and Discussion, but we will consider manuscripts where these sections have been combined.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:
<[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-294X/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-294X/homepage/ForAuthors.html)>

ANEXO E – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO BRAZILIAN JOURNAL OF BOTANY

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include: The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes. Please note (Keywords): Please provide keywords in alphabetical order without repeating any title words, which can be used for indexing purposes.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:
<<http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/40415>>