

Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiaisSpatial genetic structure of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne assessed with chloroplast microsatellite markersMaria Andréia Moreno¹, Roberto Tarazi², Elza Martins Ferraz³, Flávio Bertin Gandara⁴ e Paulo Yoshio Kageyama⁵**Resumo**

A utilização de marcadores com base em DNA cloroplastidial (cpDNA) vem auxiliando no entendimento de questões relacionadas à ecologia, evolução e estrutura genética. O conhecimento da estrutura genética inter e intrapopulacional permite delinear efetivamente estratégias de conservação e manejo de espécies arbóreas tropicais. Com a finalidade de subsidiar estratégias para conservação de *Hymenaea stigonocarpa* no Cerrado do Estado de São Paulo, foi analisada a estrutura genética espacial (EGE) em duas populações, utilizando cinco locos microssatélites cloroplastidiais (cpSSR) universais. A população de 68 indivíduos de *H. stigonocarpa* na Estação Ecológica de Itirapina (EEI) apresentou um único haplótipo, indicando um forte efeito fundador. Por sua vez, a população de 47 indivíduos de *H. stigonocarpa* em área contígua composta pela Estação Ecológica de Assis e Floresta Estadual de Assis (EEA/FEA), apresentou seis haplótipos ($\hat{n}_h = 6$) com uma diversidade haplotípica ($\hat{h} = 0,667 \pm 0,094$) moderada, demonstrando que a mesma foi fundada por um pequeno número de linhagens maternas. A análise da EGE utilizando o índice I de Moran na população EEA/FEA, indicou uma dispersão restrita de sementes. Para fins de conservação ex situ, considerando a EGE, a coleta de sementes na população EEA/FEA deverá obedecer a uma distância mínima de 750 m entre árvores matrizes.

Palavras-Chave: Jatobá-do-cerrado, Caesalpinioideae, cpSSR, Estrutura genética espacial

Abstract

The use of chloroplast DNA markers (cpDNA) helps to elucidate questions related to ecology, evolution and genetic structure. The knowledge of inter-and intra-population genetic structure allows to design effective conservation and management strategies for tropical tree species. With the aim to help the conservation of *Hymenaea stigonocarpa* of the Cerrado (Brazilian savanna) in São Paulo State, an analysis of the spatial genetic structure (SGS) was conducted in two populations using five universal chloroplast microsatellite loci (cpSSR). The population of 68 trees of *H. stigonocarpa* in the Ecological Station of Itirapina (ESI) had a single haplotype, indicating a strong founder effect. In turn, the population of 47 trees of *H. stigonocarpa* in a contiguous area that includes the Ecological Station of Assis and the Assis State Forest (ESA), showed six haplotypes ($\hat{n}_h = 6$) with a moderate haplotype diversity ($\hat{h} = 0667 \pm 0094$), revealing that it was founded by a small number of maternal lineages. The SGS analysis for the population ESA/ASF, using Moran's I index, indicated limited seed dispersal. Considering SGS, for ex situ conservation strategies in the population ESA/ASF, seed harvesting should require a minimum distance of 750 m among seed-trees.

Keywords: Jatobá-do-cerrado, Caesalpinioideae, cpSSR, Spatial genetic structure

¹Mestre em Recursos Florestais - Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: amoreno@esalq.usp.br

²Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: betotarazi@yahoo.com.br

³Bióloga Coordenadora Técnica do Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: emferraz@esalq.usp.br

⁴Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: fgandara@esalq.usp.br

⁵Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: kageyama@esalq.usp.br

INTRODUÇÃO

O conhecimento da estrutura genética, ou a forma como se distribui a diversidade genética entre e dentro de populações, permite delinear efetivamente estratégias de conservação e manejo de espécies arbóreas tropicais (TARAZI *et al.*, 2009). A estrutura genética está intimamente relacionada ao sistema de reprodução e aos padrões de migração de pólen e de sementes que ocorrem entre e dentro das populações (DEFAVARI *et al.*, 2009). Usualmente, para a obtenção de dados relacionados com estrutura genética são utilizados marcadores alozímicos ou marcadores com base em polimorfismo de DNA nuclear (AGARWAL *et al.*, 2008). A utilização de marcadores com base em DNA mitocondrial (mtDNA) e cloroplastidial (cpDNA) vem auxiliando no entendimento de questões relacionadas à ecologia, evolução e estrutura genética (OLMSTEAD e PALMER, 1994; PROVAN *et al.*, 2001; AGARWAL *et al.*, 2008; EBERT e PEAKALL, 2009). Especificamente para cpDNA, apesar do genoma ser bem conservado devido à baixa taxa de mutação, duas descobertas científico-tecnológicas permitiram sua utilização nos estudos sobre estrutura genética. A primeira foi o desenvolvimento de marcadores microssatélites cloroplastidiais (cpSSR) universais que podem ser aplicados em um grande número de espécies vegetais. Enquanto a segunda foi a descoberta de regiões polimórficas de mononucleotídeos repetitivos de maneira a elevar a variabilidade intraespecífica destes marcadores cpSSR (PROVAN *et al.*, 2001; EBERT e PEAKALL, 2009).

Os genomas cloroplastidiais são tipicamente não recombinantes e efetivamente haplóides (OLMSTEAD e PALMER, 1994). Em angiospermas o cloroplasto é de origem predominantemente materna e dessa forma, o estudo do cpDNA permite elucidar as contribuições do genoma materno, por meio das sementes, para a estrutura genética de populações. Além disso, através do estudo do cpDNA é possível a detecção de pontos de estrangulamento genético em uma população, como o efeito fundador e a deriva genética (PROVAN *et al.*, 2001; AGARWAL *et al.*, 2008; EBERT e PEAKALL, 2009).

Nos últimos anos, pesquisas referentes à genética de populações de plantas, utilizando cpDNA têm sido desenvolvidas com maior frequência (HAMILTON, 1999; COLLEVATTI *et al.*, 2003; CLOUTIER *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2006; BLANCO *et al.*, 2007; AGARWAL *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*,

2008; RAMOS *et al.*, 2009). Entretanto, apesar do aumento no número desses estudos, ainda são poucas as pesquisas realizadas com espécies vegetais do Cerrado (COLLEVATTI *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2006; BLANCO *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2009).

No Cerrado, a eficiência na dispersão de sementes para fundação de novas populações naturais de plantas é um fator muito importante para a manutenção da diversidade genética de espécies em longo prazo (MARTINS *et al.*, 2006). Isto se deve porque, com a ocorrência de constantes queimadas nesse bioma, a dispersão de sementes auxilia no estabelecimento de genótipos em áreas não afetadas pelo fogo, diminuindo o risco de perda de genótipos (IBAÑES *et al.* 2008). Sendo assim, a utilização de cpDNA pode contribuir para o conhecimento do fluxo gênico histórico e contemporâneo de populações de plantas, auxiliando no estabelecimento de estratégias efetivas para conservação do Cerrado.

Entre as espécies arbóreas de ampla distribuição e ocorrência em formações abertas do cerrado e campo cerrado está a *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne. (Fabaceae, Caesalpinioideae), popularmente conhecida como jatobá-do-cerrado (CARVALHO, 2007). A espécie apresenta flores hermafroditas, um sistema de reprodução predominante de cruzamentos, quirópterofilia como síndrome de polinização, barocoria e zoocoria como síndromes dispersão das sementes e alta diversidade genética. Além disso, representa um papel ecológico fundamental, por produzir anualmente grande quantidade de frutos que servem de alimento para a fauna terrestre (MORAES *et al.* 2007). Essas características são importantes para programas de restauração florestal, uma vez que *H. stigonocarpa* está entre as espécies recomendadas para plantio e restauração em regiões de Cerrado, em condições de solo bem drenado (DURIGAN, 2003).

O objetivo deste estudo foi analisar a estrutura genética espacial em duas populações de *H. stigonocarpa* no Cerrado do Estado de São Paulo mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais (cpSSR) universais de angiospermas visando subsidiar estratégias para conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

O estudo foi realizado em duas áreas de Cerrado do Estado de São Paulo com fisionomias e históricos contrastantes, abrangendo os muni-

cípios de Itirapina e Assis (Figura 1). As áreas pertencem a unidades de conservação administradas pelo Instituto Florestal do Estado de São Paulo, distantes 266 km uma da outra.

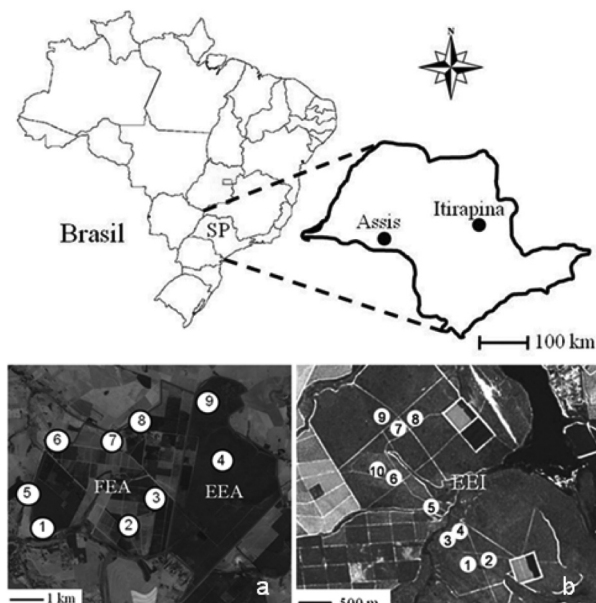


Figura 1. Mapa dos pontos de coleta nos municípios de (a) Assis (FEA/EEA) e (b) Itirapina (EEI), no Estado de São Paulo, Brasil.

Figure 1. Map of the collection sites in the cities of (a) Assis (ESA/ASF) and (b) Itirapina (ESI) in São Paulo State, Brazil.

A Estação Ecológica de Itirapina (EEI) está localizada no município de Itirapina, SP, ($22^{\circ}15'S$; $47^{\circ}49'W$) e situa-se ao limite leste do Cerrado no Estado. A área de 2.300 ha é composta por Neossolos arenosos bem drenados e abrange vegetação natural de campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado, banhados e matas ciliares ao longo dos cursos d'água (SILVA, 2005). O entorno da EEI inclui monoculturas de *Eucalyptus* spp., *Pinus* spp., *Saccharum* spp. e citros, além de pastagens, da Represa do Broa e de 300 ha de campo cerrado fazendo divisa ao nordeste (INSTITUTO FLORESTAL, 2005).

A Estação Ecológica de Assis (EEA) e a Floresta Estadual de Assis (FEA) são unidades de conservação contíguas, localizadas no município de Assis, SP, ($22^{\circ}35'S$; $50^{\circ}22'W$), e juntas somam um total de 4.480 ha. A EEA e a FEA são compostas por dois tipos de solo, Latossolo Vermelho Distrófico e Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico típico, que apresentam características similares de baixa fertilidade e com pouca retenção hídrica. A EEA possui 1.760,64 ha com cerrado *lato sensu*, dominado predominantemente por cerradão, mas também apresenta manchas de cerrado *stricto sensu* e tipos florestais ripários, como Mata de Brejo e Mata Ciliar. Por sua vez, a

Floresta Estadual de Assis (FEA) possui 2.719,36 ha e tem como objetivo a produção de madeira de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. para múltiplos usos. Contudo, a FEA apresenta inúmeras manchas de cerrado *stricto sensu* e Mata Ciliar, protegidas pelo Instituto Florestal de São Paulo (INSTITUTO FLORESTAL, 2005).

Coleta de material vegetal

Nas áreas de Itirapina e Assis os indivíduos de *H. stigonocarpa*, independente do tamanho ou fase de desenvolvimento, foram marcados com plaquetas metálicas e mapeados com auxílio de um aparelho GPS (Sistema de Posicionamento Global; Garmin GPSMAP 76S). A altura das árvores foi mensurada com régua dendrométrica e a circunferência na altura da base (CAB) com fita métrica.

Em Itirapina, dentro da EEI, por meio de um censo foram localizados e mapeados 68 indivíduos em uma área de 680 ha ($4.000\text{ m} \times 1.700\text{ m}$). Foram utilizados os mesmos indivíduos de *H. stigonocarpa* descritos em Defavari *et al.* (2009), com exceção de um que morreu. Os levantamentos de indivíduos na EEA e FEA foram realizados por caminhamento. Foram localizados e mapeados 47 indivíduos em uma área de 4.480 ha. As amostras foliares de todos os indivíduos mapeados foram coletadas, secas e armazenadas em recipientes contendo sílica gel e encaminhadas ao Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas - LARGEA, Piracicaba, SP, para a realização das análises genéticas.

Procedimentos laboratoriais

Extração e amplificação do DNA

A extração do DNA genômico total das amostras foi realizada por meio da maceração de 150 mg de tecido vegetal em nitrogênio líquido, seguindo o protocolo CTAB de Doyle e Doyle (1990). Após a extração, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio da análise comparativa com um padrão molecular conhecido (DNA λ). As amostras foram posteriormente diluídas em água miliQ para obtenção da concentração de $2,5\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Nas análises genéticas foram utilizados cinco pares de iniciadores cpSSR universais desenvolvidos para angiospermas dicotiledôneas por Weising e Gardner (1999). A reação de amplificação foi feita em solução contendo: $2,5\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de

DNA genômico; 250 μ M de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2,5 μ g.mL⁻¹ de BSA, 0,2 μ M de cada iniciador; 1 U. μ L⁻¹ de *Taq* DNA polimerase e água MiliQ, para um volume final de 12,74 μ L.

As ampliações foram realizadas em termociclador (MJ Research PTC-100), e o programa de amplificação foi constituído como descrito a seguir: uma etapa de desnaturação a 96°C por 2 minutos; 29 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento em temperatura específica para cada par de iniciadores por 1 minuto, uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão final com 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel desnaturante de poli-acrilamida a 5% em tampão TBE 1X (Tris-HCl 90 mM; EDTA 2,0 mM e Ácido Bórico 90 mM e pH 8,3). O tempo de migração eletroforética foi de uma hora e trinta minutos em cuba vertical. Os produtos da reação de amplificação foram observados após coloração com nitrato de prata segundo metodologia de Creste *et al.* (2001). O comprimento dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão DNA "ladder" de 10 pb –(Invitrogen®). Os fragmentos amplificados de diferentes comprimentos foram considerados alelos diferentes.

Análises estatísticas

Estrutura demográfica

Foi calculada a média para altura e CAB. O programa computacional SGS (DEGEN *et al.*, 2001) foi utilizado para a obtenção do índice de dispersão (R) conforme Clark e Evans (1954): $R = R_o / R_E$. Se R é igual a 1, a distribuição é aleatória; se $R < 1$, a distribuição é agregada e $R > 1$, a distribuição é uniforme. Sendo assim, $R_o = (\sum r_i) / n$ é a distância média observada do vizinho mais próximo, r_i é a distância do vizinho mais próximo e n é o número de observações. $R_E = 1 / 2\sqrt{d}$ corresponde à distância esperada do vizinho mais próximo e d é a densidade média de indivíduos/ha. Para testar a significância estatística de R foi utilizado o teste Z , em que, s é o desvio padrão: $Z = |R_o - R_E| / s$.

Diversidade haplotípica

Cada combinação alélica única entre os cinco locos cpSSR foi considerada um haplótipo, que por sua vez, foi analisado como um alelo diferente de um único loco haplóide. O número

de haplótipos (\hat{n}_h), a quantidade de haplótipos privados por população (\hat{n}_p) e a proporção de alelos privados (\hat{n}_p / \hat{n}_h) foram estimados. A diversidade haplotípica ($\hat{h} = [n_k / (n_k - 1)] (1 - \sum p_i^2)$) e o número efetivo de haplótipos ($\hat{n}_e = 1 / \sum p_i^2$) foram estimados de acordo com Nei (1987), em que, n_k corresponde ao número de indivíduos amostrados na população k e p_i refere-se à frequência do i -ésimo haplótipo.

A divergência genética entre as duas populações foi calculada com a finalidade de propor se cada unidade de conservação representa uma unidade significativa evolucionária (USE) e/ou uma unidade independente para manejo (UIM), segundo classificações propostos por Palsboll *et al.* (2007). Para esta finalidade, foi estimada a divergência genética com base nas estatísticas de Nei (1987) de populações subdivididas (H_T é a diversidade genética total, G_{ST} é a diversidade genética entre e H_S é a diversidade genética dentro) utilizando o programa computacional FSTAT (versão 2.9.3) de Goudet (2002). Para corrigir o valor de G_{ST} foi utilizado o G_{ST}' , proposto por Hedrick (2005):

$$G_{ST}' = \frac{G_{ST}(1+H_S)}{(1-H_S)}$$

Estrutura genética espacial intrapopulacional

A estrutura genética espacial intrapopulacional (EGE) foi analisada por autocorrelação espacial, empregando-se o índice I de Moran (MORAN, 1950; SOKAL e ODEN, 1978). Para a análise da EGE, os dados de cada haplótipo foram codificados para suas frequências alélicas sendo considerados genótipos homocigóticos que receberam valor 1,0 (DEGEN *et al.*, 2001). As extensões das classes de distâncias foram selecionadas para obter-se um mínimo de 50 pares de dados para cada classe selecionada. Os valores do índice I de Moran (SOKAL e ODEN, 1978) foram calculados para cada uma das classes de distância, em cada loco, e para a média dos locos dada pela expressão geral:

$$I = \frac{n \sum_i \sum_j w_{ij} z_i z_j}{w \sum_i z_i^2}$$

em que: w é a soma de todos os pares de dados usados em todas as classes de distância; i e j são a localização de cada dado em uma classe de distância e z_i é o desvio da frequência alélica. Os valores estimados do índice I de Moran foram utilizados para

testar a significância dos desvios dos valores esperados, $E(I) = -I/(n-1)$, sobre a hipótese de nulidade de distribuição aleatória (CLIFF e ORD, 1981). Foi também realizado o teste Monte-Carlo (MANLY, 1997) com 1000 permutações sobre a localização de cada genótipo a fim de obterem-se intervalos de confiança. A significância total de cada correlograma foi testada usando critérios de Bonferroni (SOKAL e WARTENBERG, 1983). Todas as análises referentes à EGE foram realizadas empregando-se o programa SGS (DEGEN *et al.*, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estrutura demográfica

Nas duas áreas de estudo os indivíduos de *H. stigonocarpa* encontravam-se agregados formando vários conjuntos, entretanto a distribuição desses conjuntos agregados (pontos) ocorreu de maneira aleatória na EEI e uniforme na EEA/FEA (Tabela 1; Figura 1 a e b, respectivamente).

Segundo Durigan *et al.* (2003), os padrões de distribuição de plantas em grandes escalas, nesse caso referindo-se à distribuição espacial dos pontos, podem estar relacionados a fatores como fertilidade do solo e condições climáticas. Contudo, a distribuição não agregada dos pontos, observada no presente estudo, sugere não haver essa relação para germinação ou estabelecimento de plântulas.

Diferentemente dos resultados obtidos para os pontos, em ambas as áreas, a distribuição espacial dos indivíduos de *H. stigonocarpa* ocorreu de maneira agregada. Esse resultado corrobora com outros estudos realizados em formações savânicas, inclusive no Cerrado brasileiro, onde a maioria das espécies apresentou uma distribuição espacial agregada (LIMA-RIBEIRO e PRADO, 2007) e onde uma dispersão restrita de sementes foi a principal responsável pela agregação de indivíduos (DEFAVARI *et al.*, 2009). Dessa forma, sugere-se que uma dispersão restrita de sementes, gerada pela barocoria e ineficiência dos dispersores, seja a principal responsável pela agregação de *H. stigonocarpa* nas populações EEI e EEA/FEA.

O contraste da altura e do CAB entre os indivíduos de *H. stigonocarpa* da EEI, que apresentaram um porte pequeno e homogêneo, e os indivíduos da EEA/FEA, que apresentaram um porte médio e heterogêneo (Tabela 1), deve-se provavelmente a fatores edafoclimáticos e a perturbações ambientais como o fogo. Os tamanhos máximos para altura e CAB dos indivíduos da EEI foram muito menores daqueles encontrados para a média da espécie (CARVALHO, 2007). Esses resultados estão, provavelmente, relacionados com restrições edáficas encontradas na EEI, que é formada por Neossolos arenosos, nutricionalmente pobres, que podem levar ao nanismo de plantas. Além do histórico de uma década de perturbações ambientais causada pelas queimadas na EEI (DEFAVARI *et al.*, 2009).

Por outro lado, na EEA/FEA os portes médios e heterogêneos dos indivíduos podem ser atribuídos aos solos nutricionalmente mais ricos do que os Neossolos encontrados na EEI. Além disso, na EEA/FEA as temperaturas são mais elevadas em relação à EEI, proporcionando uma melhor adaptação e desenvolvimento da espécie na área. Adicionalmente, nas últimas décadas, por ação humana, houve a eliminação do fogo na EEA/FEA (PINHEIRO e DURIGAN, 2007), a qual pode ter permitido o maior crescimento em altura e CAB das partes aéreas de *H. stigonocarpa*.

Diversidade haplotípica

Todos os cinco locos cpSSR utilizados amplificaram, porém, dois não apresentaram variação haplotípica. As temperaturas de anelamento definidas para cada loco variaram entre 54 e 58°C. O número de alelos por loco polimórfico variou de 2 a 4 (Tabela 2).

A população EEI apresentou a amplificação de um único fragmento e conseqüentemente, foi obtido um único haplótipo. Isso indica que essa população foi fundada por uma única linhagem materna, evidenciando o efeito fundador. O efeito fundador usualmente ocorre em uma população originada por um ou poucos genótipos (FUTUYMA, 1992). Dois estudos corroboram

Tabela 1. Aspectos demográficos de duas populações de *H. stigonocarpa* no Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil.
Table 1. Demographic aspects of two populations of *H. stigonocarpa* in the Cerrado area of São Paulo State, Brazil.

População	n	d	$R_{\text{indivíduos}}$	R_{pontos}	Altura média (m) (DP; Min. – Max.)	CAB média (cm) (DP; Min. – Max.)
EEI	68	0,1	0,144**	0,799 ^{ns}	3,33 (0,53; 0,56 – 0,57)	26,21 (4,24; 1,6 – 64)
EEA/FEA	47	0,01	0,260**	1,623**	5,27 (3,03; 1 – 13)	39,9 (34,31; 3,8 – 142)

Nota: EEI = Estação Ecológica de Itirapina; EEA/FEA = Estação Ecológica de Assis e Floresta Estadual de Assis; n = número de indivíduos marcados; d = densidade de indivíduos por hectare; $R_{\text{indivíduos}}$ = índice de dispersão dos indivíduos; R_{pontos} = índice de dispersão dos pontos; DP = desvio padrão.

com essa hipótese (efeito fundador) na EEI. Um estudo realizado por Defavari *et al.* (2009), utilizando marcadores alozímicos em *H. stigonocarpa* encontrou indícios de gargalos genéticos na população EEI; e outro, realizado por Ramos *et al.* (2008), utilizando marcadores cloroplastidiais específicos para o gênero *Hymenaea*, em uma população próxima da EEI, apresentou a dominância de um único haplótipo.

Contrastando com os resultados da população EEI, a população EEA/FEA apresentou a amplificação de onze fragmentos e houve a formação de seis haplótipos ($\hat{n}_h = 6$) com uma diversidade haplotípica ($\hat{h} = 0,667 \pm 0,094$) moderada (Tabela 3). Dentre os seis haplótipos encontrados, cinco foram exclusivos (Tabela 3). Apenas o haplótipo 4 é compartilhado com a população da EEI (Figura 2). O número efetivo de haplótipos ($\hat{n}_e = 2,965$) foi aproximadamente a metade do número total devido à heterogeneidade das frequências dos haplótipos (Figura 2). Os resultados do presente estudo, quando comparados a outros que utilizaram o mesmo marcador cpSSR (p.e. MARTINS *et al.*, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2008), sugerem que a EEA/FEA foi fundada por um número pequeno de linhagens maternas.

Em relação ao único haplótipo compartilhado entre as duas populações pode-se inferir que, esse compartilhamento está relacionado com a existência de um ancestral remoto comum, cuja migração para as áreas do extremo sul do cerra-

do do Estado de São Paulo tenha ocorrido provavelmente após a última era glacial há 5500 anos (RAMOS *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2009).

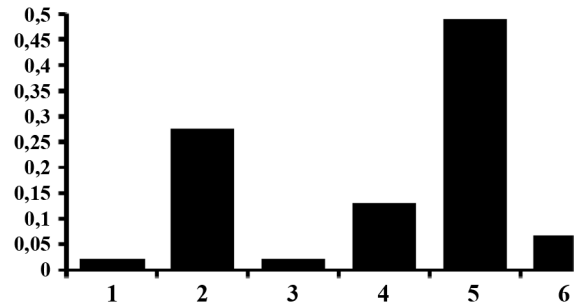


Figura 2. Frequências dos haplótipos de *H. stigonocarpa* na Estação Ecológica de Assis e Floresta Estadual de Assis (EEA/FEA).

Figure 2. Haplotype frequencies of *H. stigonocarpa* in the Ecological Station of Assis and Assis State Forest (ESA/ASF).

A alta divergência genética ($G_{ST}' = 0,660$) entre as populações, decorrente da existência de alelos exclusivos da EEA/FEA, faz com que as unidades de conservação de Assis e Itirapina devam ser tratadas como Unidades Significativas Evolutivas (USE) e como Unidades Independentes para o Manejo (UIM). A designação de uma USE implica que o isolamento reprodutivo das populações possa ter levado a diferenças adaptativas, que por sua vez representam componentes evolutivos significativos para a espécie. Seguindo o mesmo raciocínio de uma USE, a designação de uma UIM significa que os caracteres evolutivos específicos de cada população

Tabela 2. Locos cpSSR com as respectivas temperaturas de anelamento (Ta), seqüência dos iniciadores, motivo, número de alelos e amplitudes alélicas em pares de base para duas populações de *H. stigonocarpa* no Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil.

Table 2. CpSSR loci with their respective hybridization temperature (Ta); primer sequence; motif, number of alleles and allele amplitude in base pairs for two populations of *H. stigonocarpa* in the Cerrado of São Paulo, Brazil.

Locos	Ta (°C)	Seqüência dos iniciadores (5'-3')	Motivo*	Alelos	Amplitude alélica (pb)
ccmp02	58	GATCCCGGACGTAATCCTG ATCGTACCGAGGGTTCTGAAT	(A) ₁₁	3	250-280
ccmp03	54	CAGACCAAAAAGCTGACATAG GTTTCATTTCGGCTCCTTTAT	(T) ₁₁	1	108-122
ccmp05	54	TGTTCCAATATCTTCTTGTCATTT AGGTTCCATCGGAACAATTAT	(C) ₇ (T) ₁₀ (T) ₅ C(A) ₁₁	2	114-116
ccmp07	56	CAACATATAACCACTGTCAAG ACATCATTATTGTATACTCTTTC	(A) ₁₃	4	138-142
ccmp10	56	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	(T) ₁₄	1	106-112

Nota: *: motivo observado por Weising e Gardner (1999) em *Nicotiana tabacum*.

Tabela 3. Estimativa da diversidade genética para haplótipos cloroplastidiais em duas populações de *H. stigonocarpa*.

População	\hat{n}_h	\hat{n}_e	\hat{n}_p	\hat{n}_p / \hat{n}_h	\hat{h}
EEI	1	1,000	0	0	-
EEA/FEA	6	2,965	5	83%	0,667

Nota: \hat{n}_h = número de haplótipos; \hat{n}_e = número efetivo de haplótipos por loco; \hat{n}_p = número de haplótipos exclusivos; \hat{n}_p / \hat{n}_h = proporção de haplótipos privados, \hat{h} = diversidade haplotípica.

necessitam ser monitorados e manejados separadamente. Assim, pode-se iniciar uma estratégia de conservação evolutivo-adaptativa (CEA) (FRAZER e BERNATCHEZ, 2001), sem interferir em aspectos evolutivos de caráter regional, como na adaptabilidade local (PALSOLL *et al.*, 2007), devido à baixa conectividade entre as populações EEI e EA/FEA.

Desta forma, programas visando o enriquecimento, a restauração florestal ou o melhoramento de *H. stigonocarpa* devem contemplar os genótipos de cada USE para que os mesmos não sejam comprometidos no futuro com uma falta de adaptação local (CAMPBELL, 1979; MCKAY *et al.*, 2005; BOWER e AITKEN, 2008). Adicionalmente, em cada UIM o monitoramento e as estratégias de conservação e manejo devem visar à manutenção diversidade genética local para que a espécie sobreviva às estocasticidades ambientais (p.e. mudanças climáticas e fogo) e genéticas (p.e. deriva genética) (FRANKEL e SOULÉ, 1981).

Estrutura genética espacial intrapopulacional (EGE)

Tendo em vista que a população EEI apresentou um único haplótipo, não foi possível analisar a EGE nesse caso. Entretanto, a análise de EGE dos haplótipos na população EEA/FEA utilizando o I de Moran revelou que a maior concentração de haplótipos semelhantes foi encontrada num raio de 25 m. Esta semelhança tendeu a diminuir gradualmente até os 75 m, com a completa ausência de EGE aos 100 m (Figura 3 a). Essa análise da EGE, em micro escala, demonstrou que as contribuições do genoma materno ficam restritas até 75 m. Ou seja, provavelmente a barocoria esteja atuando mais fortemente do que a zoocoria em *H. stigonocarpa*, causando uma dispersão restrita de sementes. Resultados semelhantes, utilizando cpDNA, foram encontrados para duas espécies do cerrado, *Caryocar brasiliensis* (COLLEVATTI *et al.*, 2003) e *Solanum lycocarpum* (MARTINS *et al.*, 2006), e para uma espécie amazônica, *Manilkara huberi* (AZEVEDO *et al.*, 2008).

Numa análise em macro escala, com classes de distância de 250, 750, 1500 e 3000 m, a EGE foi significativa até 750 m (Figura 3b). Essa análise demonstrou que além de uma dispersão restrita de sementes, pode ter ocorrido um fenômeno de adaptação local dos haplótipos dentro da EEA/FEA. Apesar de desconhecer a natureza de ligação dos marcadores cpDNA com as características metabólicas dos cloroplastos, não

se pode descartar a hipótese de que cada planta contém diferentes genes de adaptação às diferentes condições ambientais (luminosidade, nutrientes). Isso pode ser demonstrado pela agregação de haplótipos em fisionomia diferentes (Figura 4), como o haplótipo 5 com 85% de sua presença na fisionomia cerradão, local de alta densidade de plantas, as quais realizam intensa competição por luminosidade. Há também os haplótipos 1, 3, 4 e 5 com 100% de sua presença na fisionomia de cerrado aberto, local de baixa densidade e alta luminosidade. Apenas o haplótipo 6 teve uma distribuição quase equitativa com 2 indivíduos (67%) no cerrado aberto e um (33%) no cerradão. Apesar da EGE ser significativa até 750 m, alguns haplótipos encontravam-se 7 km distantes uns dos outros, indicando a possibilidade de dispersão a longas distâncias (Figura 4).

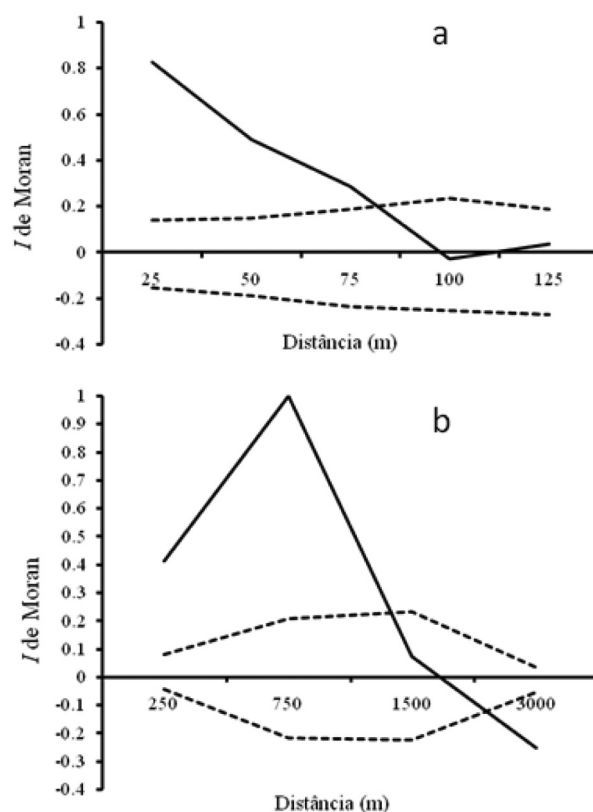


Figura 3. Correlograma para haplótipos de *H. stigonocarpa* utilizando o valor observado (—) e intervalo de confiança a 95% (- -) do I de Moran na população EEA/FEA, Assis.

Figure 3. Correlogram for haplotypes of *H. stigonocarpa* using Moran's I observed (—) and 95% confidence intervals (- -) in the ESA/ASF population, Assis.

A análise da EGE em macro escala na EEA/FEA demonstrou a agregação de indivíduos e haplótipos, o que aumenta vulnerabilidade destes haplótipos diante de alguma estocasticidade ambiental. Tarazi *et al.* (2009) alertam que plantas

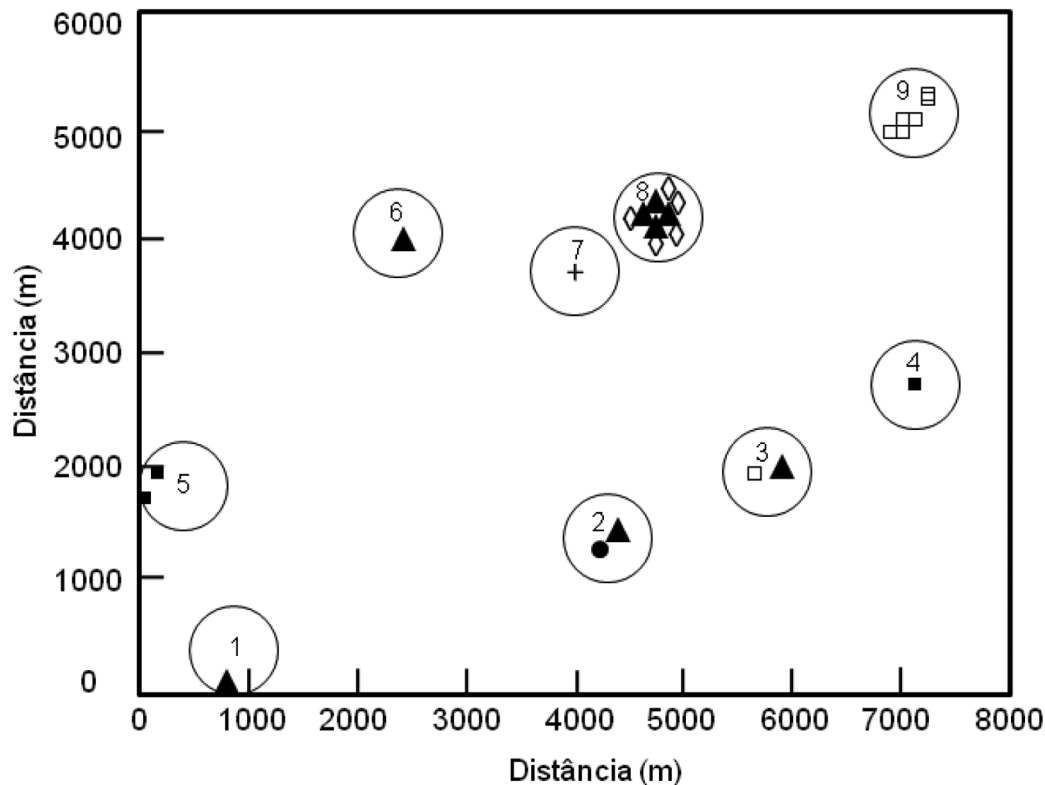


Figura 4. Mapa dos pontos de coleta (1 a 9) e haplótipos (1: •; 2: ▲; 3: +; 4: ◇; 5: □; 6: ■) na população EEA/FEA, Assis.

Figure 4. Map of the collection sites (1 to 9) and haplotypes (1: •; 2: ▲; 3: +; 4: ◇; 5: □; 6: ■) in the ESA/ASF population, Assis.

espacialmente agregadas e com EGE, estão mais propensas à perda alélica, porque os agregados em uma pequena área têm uma maior probabilidade de serem eliminados pelo homem ou por fenômenos naturais. Logo, qualquer perda de área dentro da EEA/FEA, pode resultar na perda de haplótipos raros. Dessa forma, generalizando os resultados obtidos para fragmentos florestais, qualquer redução de um fragmento florestal devido à queimada ou expansão agrícola, pode eliminar alelos com alto potencial adaptativo e dessa forma conduzindo *H. stigonocarpa* à extinção pela perda de diversidade genética.

Para fins de conservação *ex situ*, considerando a EGE, a coleta de sementes na população EEA/FEA, deverá obedecer a uma distância mínima de 750 m entre indivíduos. Dessa forma, a diversidade alélica será contemplada, característica importante em bancos de germoplasma. Adicionalmente, a amostragem terá apenas indivíduos não aparentados maternamente, reduzindo efeitos futuros gerados pela depressão endogâmica. Contudo, por causa da baixa densidade de indivíduos na EEA/FEA a coleta de sementes que deveria respeitar uma distância mínima de 750 m entre matrizes torna-se inviável. Nesse caso, seria necessário complementar a coleta de sementes com matrizes localizadas em áreas de reserva legal (RL)

ou em áreas de preservação permanente (APP) no entorno da área em questão. Logo, é fundamental a manutenção das RLs e APPs na conservação de *H. stigonocarpa* e para outras espécies do cerrado.

CONCLUSÕES

O uso de marcadores cpSSR universais em *H. stigonocarpa* permitiu detectar efeitos de gargalos genético e analisar a EGE.

A população EEI apresentou um forte efeito fundador, sendo originado por uma única linhagem materna.

A população EEA/FEA apresentou uma dispersão restrita de sementes.

Coletas de sementes visando maximizar a diversidade de haplótipos na EEA/FEA devem ser realizadas a partir de árvores maternas distantes, no mínimo, 750 m entre si.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Mestrado de Maria Andréia Moreno (Proc.2006/59386-1) e pela bolsa de doutorado de Roberto Tarazi (Proc.2006/04490-9); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa de Paulo Yoshio Kageyama; ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo (IF) pela licença de coleta e utilização da área (Proc.44.184/2006); aos bolsistas Gabriela Rocha Defavari, Guilherme Moro, Bruna Ibañes e Lais Ribeiro da Silva do LARGEA/LCF/ESALQ/USP pelos auxílios em campo e no laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, n.27, p.617-631, 2008.

AZEVEDO, V.C.R.; KANASHIRO, M.; GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A.Y. Variabilidade de cpDNA em *Minilkara huberi*, espécie sob manejo sustentável na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.7, p.858-867, 2008.

BLANCO, A.J.V.; PEREIRA, M.F.; COELHO, A.S.G.; CHAVES, L.J. Diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) por meio de análise de sequências de cpDNA. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.3, p.169-175, set. 2007.

BOWER, A.D.; AITKEN, S.N. Ecological genetics and seed transfer guidelines for *Pinus albicaulis* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.95, p.66-76, 2008.

CAMPBELL, R.K. Genecology of Douglas-fir in a watershed in the Oregon cascades. **Ecology**, Washington, v.60, p.1036-1050, 1979.

CARVALHO, P.E.R. Jatobá-do-cerrado - *Hymenaea stigonocarpa*. **Circular técnica Embrapa Florestas**, Colombo, n.133, p.1-8, 2007.

CLARK, P.J.; EVANS, F.C. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. **Ecology**, Washington, v.4, n.35, p.445-453, 1954.

CLIFFE, A.D.; ORD, J.K. **Spatial processes-methods and applications**. London: Pion Press, 1981. 389p.

CLOUTIER, D.; PÓVOA, J.S.R.; PROCOPIO, L.C.; LEÃO, N.V.M.; WADT, L.H.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.54, n.6, p.270-274, 2005.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p.105-115, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, n.4, p.299-306, 2001.

DEFAVARI, G.R.; TARAZI, R.; MORENO, M.A.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.K. Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne na Estação Ecológica de Itirapina, SP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.37, n.81, p.89-98, 2009.

DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS-Spatial Genetic Software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. **Journal of Heredity**, Washington, v.92, p.447-449, 2001.

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

DURIGAN, G. Bases e diretrizes para a restauração da vegetação de cerrado. In: KAGEYAMA, P.Y.; OLIVEIRA, R.E.; MORAES, L.F.O.; ENGEL, V.E.; GANDARA, F.B. (Ed.). **Restauração ecológica de sistemas naturais**. Botucatu: FEPAP, 2003. p.187-204.

DURIGAN, G.; RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; SIQUEIRA, M.F.; FRANCO, G.A.D.F. Padrões fitogeográficos do cerrado paulista sob uma perspectiva regional. **Hoehnea**, São Paulo, v.30, n.1, p.39-51, 2003.

EBERT, D.; PEAKALL, R. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.9, p.673-690, 2009

FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.

- FRAZER, D.J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. **Molecular Ecology**, Oxford, n.10, p.2741-2752, 2001.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- GOUDET, J. **FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Lausanne: Lausanne University. Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 07 Mar. 2008.
- HAMILTON, M.B. Tropical tree gene flow and seed dispersal: deforestation affects the genetic structure of the surviving forest fragments. **Nature**, London, v.401, n.9, p.129-130, 1999.
- HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, Lancaster, v.59, n.8, p.1633-1638, 2005.
- IBAÑES, B.; TARAZI, R.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Distribuição espacial de *Diospyros hispida* por classe de diâmetro em uma parcela no cerrado da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina, SP. In: 16º SIICUSP - SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 16, Ribeirão Preto, 2008. **Resumos...** Ribeirão Preto: USP, 2008.
- INSTITUTO FLORESTAL. **Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo**. São Paulo: SMA/IF/Imprensa Oficial, 2005.
- LIMA-RIBEIRO, M.S.; PRADO, E.C. Distribuição espacial de uma população de *Vernonia aurea* Mart. ex DC. (Asteraceae) em um fragmento de cerrado no município de Caiapônia, GO, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.3, p.81-89, 2007.
- MCKAY, J.K.; CHRISTIAN, C.E.; HARRISON, S.; RICE, K.J. "How local is local?": a review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. **Restoration Ecology**, Tucson, v.13, n.3, p.432-440, 2005.
- MANLY, B.F.J. **Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in biology**. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1997. 399p.
- MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.-Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation genetics**, Arlington, v.7, p.957-969, 2006.
- MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em pequenas populações fragmentadas e em árvores isoladas de *Hymenaea stigonocarpa*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.74, p.75-86, 2007.
- MORAN, P.A.F. Notes on continuous stochastic phenomena. **Biometrika**, Cambridge, v.37, n.2, p.17-23, 1950.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.
- OLMSTEAD, R.G.; PALMER, J.D. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. **American Journal of Botany**, Columbus, n.81, p.1205-1224, 1994.
- PALSBOLL, P.J.; BERUBE, M.; ALLENDORF, F.W. Identification of management units using population genetic data. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.22, n.1, p.11-16, 2007.
- PINHEIRO, E.S.; DURIGAN, G. Evolução fisionômica do cerrado (1962-2006) na Estação Ecológica de Assis, São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 58, 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Botânica, 2007.
- PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P.M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.16, n.3, 2001.
- RAMOS, A.C.S.; LEMOS-FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. **Journal of Heredity**, Washington, v.100, n.2, p.206-216, 2009.
- RAMOS, A.C.S.; LEMOS-FILHO, J.P.; RIBEIRO, R.A.; SANTOS, F.R.; LOVATO, M.B. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. **Annals of Botany**, Oxford, v.100, p.1219-1228, 2008.

- SILVA, D.A. Levantamento do meio físico das Estações Ecológica e Experimental de Itirapina, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.17, n.1, p.113-128, 2005.
- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology: 1- methodology. **Biological Journal of the Linnean Society**, Oxford, v.10, p.199-228, 1978.
- SOKAL, R.R.; WARTENBERG, D.E. A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. **Genetics**, Pittsburgh, v.105, p.219-237, 1983.
- TARAZI, R; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Conservation Genetics**, Arlington, 2009. Disponível em: DOI 10.1007/s10592-009-9939-4
- WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v.42, p.9-19, 1999.

Recebido em 03/04/2009

Aceito para publicação em 28/10/2009

