

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Ecologia e diversidade genética de *Diospyros hispida* Alph. D.C. em duas  
áreas de cerrado no Estado de São Paulo**

**Bruna Ibanes**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais.  
Opção em: Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba  
2012**

Bruna Ibanes  
Bióloga

**Ecologia e diversidade genética de *Diospyros hispida* Alph. D.C. em duas áreas de cerrado no estado de São Paulo**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr: **PAULO YOSHIO KAGEYAMA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba  
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Ibanes, Bruna

Ecologia e diversidade genética de *Diospyros hispida* Alph. D.C. em duas áreas de cerrado no Estado de São Paulo / Bruna Ibanes - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

109 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Caqui do Cerrado 2. Diversidade genética 3. Estação ecológica 4. Propagação vegetativa I. Título

CDD 634.451  
I12e

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

**DEDICAO**

*Ao Eduardo Vilalta Aquiar.*

*Aos meus pais Maria e Luiz.*

*A minha irmã Aline.*



*"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."*

*Isaac Newton*



## AGRADECIMENTOS

Quero expressar meu reconhecimento e gratidão a todos que de alguma forma ajudaram na execução deste trabalho, cada um representando uma peça importante e essencial na minha vida, em especial:

Á Deus, que me permitiu que eu chegasse até aqui, finalizando mais uma etapa da minha vida. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, por ter me aceito como sua orientada, por todos os ensinamentos, pelas críticas sempre construtivas, por sugestões durante cada etapa realizada neste trabalho, por me mostrar a importância das suas diversas linhas de pesquisa em favor de um objetivo maior: a Conservação das Florestas. Com o senhor aprendi amar o Cerrado! Agradeço também por toda conversa descontraída, reuniões e almoços sempre divertidos... Enfim obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Flávio Gandara, por estar sempre pronto a ajudar, por se envolver totalmente em cada etapa deste trabalho, pelas valiosas dicas e sugestões, mais principalmente por todo carinho que teve comigo e meu trabalho. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky, por todo ensinamento, por sua prontidão e preocupação em saber se de fato compreendi suas explicações e sugestões. Obrigada por me ensinar sempre com muita clareza, dedicação, carinho e humildade. O senhor é um exemplo de vida acadêmica; obrigada por tudo!

Ao amigo e pesquisador Dr. Roberto Tarazi, que desde minha iniciação científica sempre me acompanhou e auxiliou. Agradeço por todos os ensinamentos na área de genética, mas principalmente por ter acreditado em mim, você foi peça chave para a realização deste trabalho! A Monita Tarazi, pelas dicas, sugestões e correções, mais principalmente pela paciência.

A grande amiga Msc. Maria Andréia Moreno, por me ensinar e acompanhar cada etapa do meu trabalho, principalmente nas atividades laboratoriais, pois com toda a sua habilidade e precisão possibilitou que meu caminho fosse mais agradável! Déinha muito obrigada pela paciência e pelo carinho!

Ao amigo Msc. Evandro Vagner Tambarussi (Quê?) por sua prontidão em me auxiliar, em sugerir e até em criticar... Com você aprendi muito, principalmente a acreditar, a ter sempre um sorriso no rosto (mesmo que tudo esteja dando errado) e continuar o trabalho. Muito Obrigada!



A amiga Msc. Lia Maris Orth Ritter por toda ajuda em cada etapa desse trabalho, suas sugestões, correções e dicas fizeram a diferença. Lia obrigada pelo carinho e preocupação, com você aprendi muito, principalmente a ter fé e acreditar que tudo acaba dando certo!

A Prof. Dra. Karina Martins, por toda ajuda na interpretação dos dados genéticos, pelas sugestões e críticas, sempre com muita paciência, dedicação, mas principalmente por sua prontidão. Muito obrigada por tudo!

A minha família, mais principalmente a minha mãe: Maria, por tudo o que me ensinou se hoje consegui chegar até aqui foi porque você me ajudou muito e sempre esteve presente em minha vida, tenho muito orgulho de você! A minha irmã Aline por estar sempre pronta a ajudar e por me dar força. A minha avó Anna, por acreditar em mim: Você consegue! Amo todos vocês!

Ao Eduardo, pelo sorriso e lindo brilho nos olhos a me ver retornando das coletas em campo, pelo incentivo, paciência, companheirismo, pelas caronas que me socorriam e por me dar força quando eu achava que não iria conseguir. Dú obrigada por estar sempre comigo, amo você!

A família LARGEA: Andréia (Déia), Maria Carolina (Carol), Elza Martins Ferraz, Evandro, Giullia, Rebeca, Luana, Jéssica, Lia, Renata, Gabí, Murilo, Felipe, Vinícius, Vanessa, Andréia, Valéria e Amanda pelo espírito de equipe, pelas risadas, ou melhor, gargalhadas, pelos almoços e aniversários sempre muito divertidos, pelos bolos, presentes, mais principalmente pela amizade, força (no final tudo dá certo) e incentivo (agora vai!). Nunca me esquecerei de vocês amigos tão queridos. Muito obrigada, mesmo!

Aos melhores companheiros de campo: Francisco Carlos Antonioli (Chico), Carol, Roberto, Lia, Renata, Gilson Gianez (EEI), Edivaldo Furlan (FEA), Éric (Sudão) e Vinícius, vocês fizeram o trabalho de campo mais produtivo e muito mais divertido!

A todos os funcionários do Instituto Florestal - Assis, em especial ao Edivaldo Furlan e a Giselda Durigan.

A todos os funcionários do Instituto Florestal – Itirapina, em especial ao Gilson Gianez e ao Paulo Henrique Peira Rufino.

Aos sempre amigos da UNIMEP: Tassiana, Grazielle, Felipe, Emiliana, Rejane, Mariana e Mirela, mas em especial a Tassi e a Grazi que me acompanharam, incentivaram, me deram força e por me ajudarem durante os 4 anos de graduação, os 2 anos de pós-graduação e também pelos bons momentos de descontração, nunca vou esquecer nossos

churrascos, almoços, aniversários e da nossa “farra” na UNIMEP, afinal aula de sábado a tarde não é fácil ... Amo vocês!

Aos professores da UNIMEP, que contribuíram muito para minha formação profissional e pessoal, mas especialmente ao Luiz Antonio Rochelle (Rochelinho), Simone Sendin, Simone Godoi, Maria Eliana Navega, Leda Favetta, Margarete Costa (Marga) e a Kayna Agostini. Muito Obrigada!

Aos amigos da pós-graduação: Isabel, Luisa, Lia, Renata, Silmara, Douglas, Shirley e Miguel (Miguelito). Com vocês o caminho tornou mais suave, repleto de bons momentos e muitos risos. Vocês realmente fizeram a diferença naquela jornada de aulas... Enfim, adorei a presença de vocês!

A toda equipe do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento coordenado pelo Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, que me auxiliaram no desenvolvimento da biblioteca genômica. Gostaria de agradecer especialmente a Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi, a Dra. Aluana Abreu, ao Msc. Carlos Eduardo de Araújo Batista, ao Msc. Alessandro Alves-Pereira e a Msc. Carolina Grando que estiveram sempre prontos a auxiliar e esclarecer minhas dúvidas. Muito obrigada!

Aos professores da ESALQ em especial: Paulo Yoshio Kageyama, Flávio Gandara, José Baldin Pinheiro e ao Roland Vencovsky. Obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais, Zé Martins, Eliezer, Catarina e em especial a Margarete Zadoná Pinese e a Giovana Oliveira, sem vocês duas acho que teria desistido, vocês me ajudaram muito no momento em que mais precisei! Muito Obrigada!

Ao Jefferson Lordello Polizel por estar sempre pronto a me auxiliar na construção dos mapas e no manuseio dos dados de campo. Jefferson obrigado por tudo, principalmente pela paciência!

A Silvia Maria Zinsly pela cuidadosa revisão dessa dissertação. Muito Obrigada!

A CAPES por ter concedido a bolsa de mestrado.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	17
1.1 OBJETIVO .....	19
1.2 HIPÓTESES .....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 Filogeografia e o Bioma Cerrado .....	21
2.2 O Bioma Cerrado .....	23
2.3 A Família Ebenaceae e o gênero <i>Diospyros</i> Dalechamp ex Linnaeus .....	27
2.4 <i>Diospyros hispida</i> Alph. D.C. ....	29
2.5 Conseqüências genéticas da fragmentação ambiental .....	33
2.6 Sistemas reprodutivos em espécies do Cerrado .....	34
2.7 Marcadores microssatélites .....	36
2.8 Estrutura Genética .....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
3.1 Áreas de estudo e amostragem .....	43
3.1.1 Estação Ecológica de Itirapina .....	43
3.1.2 Floresta Estadual de Assis .....	48
3.2 Procedimentos laboratoriais .....	50
3.2.1 Extração e quantificação do DNA .....	50
3.2.2 Construção de biblioteca genômica enriquecidas com microssatélites .....	51
3.2.3 Seqüenciamento da região de interesse dos plasmídeos .....	56
3.2.4 Desenho dos oligonucleotídeos de DNA .....	56
3.2.5 Caracterização e genotipagem dos microssatélites .....	57
4 ANÁLISE DE DADOS .....	59
4.1 Estrutura demográfica .....	59
4.2 Diversidade genética .....	60
4.3 Diferenciação de clones e diversidade clonal .....	60
4.4 Estrutura genética espacial .....	61
5 RESULTADOS .....	63
5.1 Aspectos demográficos .....	63
5.2 Avaliação da eficiência da extração de DNA .....	65

5.3 Transferabilidade e amplificação dos locos microssatélites nucleares .....	66
5.4 Desenvolvimento de biblioteca enriquecida com microssatélites.....	68
5.5 Caracterização dos locos microssatélites .....	70
5.6 Diversidade e heterogeneidade clonal.....	78
5.7 Estrutura genética espacial.....	78
6 DISCUSSÃO .....	81
6.1 Estrutura Demográfica .....	81
6.2 Estrutura genética espacial.....	83
6.3 Diversidade genética em espécies com populações apresentando potencial para propagação vegetativa.....	86
6.4 Implicações do estudo para conservação da biodiversidade do Cerrado .....	90
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
REFERÊNCIAS.....	95

## RESUMO

### **Ecologia e diversidade genética de *Diospyros hispida* Alph. DC. em duas áreas de cerrado no estado de São Paulo.**

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a estrutura genética e demográfica de *Diospyros hispida* Alph. D. C., de modo a gerar informações que possibilitem ações quanto a sua conservação e manejo. Como *D. hispida* possui ampla distribuição no Cerrado, duas áreas com fisionomias distintas foram escolhidas: Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina – SP (EEI) e a Floresta Estadual de Assis, Assis – SP (FEA), ambas administradas pelo Instituto Florestal do Estado de São Paulo, representando alguns dos últimos remanescentes de Cerrado no estado. Em ambas as localidades foram mapeados 100 indivíduos mais próximos, já que o estudo teve como uma das hipóteses verificar se a agregação dos indivíduos é devido à existência de propagação vegetativa. Para a realização do trabalho foram desenvolvidos marcadores moleculares para a espécie. Os sete marcadores revelaram a existência de 27 genes para a população da EEI e 15 para a população da FEA, excesso de heterozigotos e significativo índice de fixação para a EEI ( $\hat{f} = -0,376$ ) e FEA ( $\hat{f} = -0,512$ ), mesmo quando avaliados somente os genes de ambas as populações, o índice de fixação manteve-se negativo para a EEI ( $\hat{f} = -0,209$ ) e FEA ( $\hat{f} = -0,115$ ). Em ambas as populações foram detectadas pequena estrutura genética espacial (EGE) nas menores classes de distância para o conjunto de genes e rametes. Os resultados da EGE e da heterogeneidade clonal mostraram que os genótipos estão amplamente distribuídos e que os agrupamentos são formados por diferentes genótipos. Os valores da coancestria revelaram a existência de reprodução sexuada em ambas as populações, porém pode-se observar alguns indícios da propagação vegetativa. Esse resultado corrobora com diversos trabalhos que incitam a predominância da alogamia, reforçando, portanto, a importância do desenvolvimento de mais *primers* para a espécie. Estudos sobre o sistema reprodutivo da espécie também são importantes para elucidar essas questões, além de fornecer dados sobre agregação espacial dos indivíduos, que pode ser resultado da dispersão de sementes. A coleta de sementes visando à conservação deve ser realizada em indivíduos com genótipos diferentes. Um meio de evitar a seleção de indivíduos com alguma carga genética que venha diminuir o sucesso reprodutivo das plantas no banco de germoplasma é através da cuidadosa seleção de mudas, nesse caso devem-se excluir mudas albinas, que exibem má-formação e com crescimento lento, atentando-se em maximizar a diversidade genética e manter o tamanho efetivo mínimo para garantir que os indivíduos tenham condições de sobreviver a possíveis fatores estocásticos.

Palavras-chave: *Diospyros hispida* (caqui-do-cerrado); Propagação vegetativa no cerrado; Estação Ecológica de Itirapina; Floresta Estadual de Assis



## ABSTRACT

### **Ecology and genetic diversity of *Diospyros hispida* Alph. DC. in two areas of Cerrado in São Paulo.**

This study aimed to evaluate the genetic and demographic structure of *Diospyros hispida* Alph. D. C. in order to generate informations that could enable its conservation and management. Considering that *D. hispida* has a wide population distribution all over Cerrado, two areas with different physiognomies were chosen for studying. These places were Ecological Station Itirapina, Itirapina - SP (EEI) and Assis State Forest, Assis - SP (FEA), both managed by Forest Institute State of São Paulo, representing some of the last remaining areas of Cerrado in the state. In these both locations were sampled 100 close-individuals, since the study was to verify a hypothesis that the aggregation of them is due to the existence of vegetative propagation. Specific microsatellites were developed to carry out the work. The seven markers revealed the existence of 27 genets for the population from EEI and 15 genets for the population from FEA. There were significant excess of heterozygotes and fixation index for the EEI ( $\hat{f} = -0.376$ ) and FEA ( $\hat{f} = -0.512$ ). Even when only genets of both populations were evaluated, the fixation index remained negative for the EEI ( $\hat{f} = -0.209$ ) and FEA ( $\hat{f} = -0.115$ ). In both populations were detected little spatial genetic structure (SGS) over the shortest distances considering the set of genets and ramets. The results of the SGS and clonal heterogeneity showed that the genotypes are widely distributed and that the clusters are formed by different genotypes. The values of coancestry revealed the existence of sexual reproduction in both populations, but we can observe some evidence of vegetative propagation. This result concurs with several studies that encourage the predominance of outcrossing, reinforcing thus the importance of developing more primers for the species. Studies on the reproductive system of the specie are also important to clarify these issues, and provide data on spatial aggregation of individuals, which may result from seed dispersal. The collection of seeds for conservation should be carried in individuals with different genotypes. One way to avoid the selection of individuals with a genetic background that may reduce the reproductive success of plants in the germplasm bank is through the careful selection of plants. In this case albino plants, bad-developed plants and slow-growth plants should be excluded, to maximize genetic diversity and maintain the minimum effective size to ensure that individuals are able to survive in likely randomized factors.

Keywords: *Diospyros hispida* (caqui-do-cerrado); Vegetative propagation in the cerrado; Ecological Station Itirapina; Assis State Forest





## 1 INTRODUÇÃO

A filogeografia vem sendo utilizada para auxiliar na compreensão de vários aspectos da genética de populações, por meio desses estudos pode-se observar que as oscilações climáticas do período quaternário tiveram grande influência nos atuais padrões de diversidade genética, estrutura genética e distribuição espacial de espécies de plantas e animais. As oscilações climáticas também foram responsáveis por alterações na cobertura vegetal do Cerrado, gerando populações periféricas, fragmentadas e empobrecidas geneticamente, quando comparada às grandes e contínuas populações, hoje extintas (COLLEVATTI et al., 2003, RAMOS et al., 2007; ECKERT et al., 2008; COLLEVATTI et al., 2009).

O Cerrado possui aproximadamente 2 milhões km<sup>2</sup>, ocupando cerca de 24% do território nacional (MMA, 2006), é o segundo maior bioma brasileiro sendo superado em área somente pela Amazônia. A biodiversidade total do Cerrado foi estimada em 160.000 espécies de plantas, animais e fungos. A diversidade da flora vascular nativa é de aproximadamente 11.627 espécies (MENDONÇA et al., 2008), sendo 44% da flora endêmica (RATTER et al., 2003). A ampla diversidade de espécies nativas do Cerrado vem sendo utilizada como fonte de subsistência por comunidades tradicionais que protegem o bioma (KLINK; MACHADO, 2005), já que as espécies da flora nativa do Cerrado têm alto potencial para o uso na alimentação, medicinais, fitoterápicos, bem como na produção de óleos essenciais (DURIGAN, 2003; KLINK; MACHADO, 2005).

Apesar de ser considerado um “hotspot”, rico em biodiversidade e endemismo, o Cerrado está ameaçado por atividades antrópicas. O desmatamento do Cerrado no Brasil chega a 1,5% ou 3 milhões de hectares ano<sup>-1</sup> (MACHADO et al., 2004), mais da metade da sua área total foi transformada em monoculturas e pastos de gramíneas exóticas nos últimos 35 anos. A taxa de desmatamento no Bioma é de 22.000 a 30.000 Km<sup>2</sup> por ano, essa taxa é maior do que a atual taxa de desmatamento da Amazônia, isso deve-se pelo menos em parte a legislação ambiental brasileira, na qual a porcentagem a ser mantida como reserva legal é de 20%, já na Amazônia essa proporção é bem maior, cerca de 80% (KLINK ; MACHADO, 2005; NAZARENO et al., 2012).

Desta forma, o Bioma está sendo destruído com uma velocidade superior à sua capacidade de regeneração natural e ao conhecimento gerado para sua proteção e conservação sendo que o Cerrado possui apenas 7,44% de sua área protegida por unidades de conservação, federais, estaduais e municipais, sendo que aproximadamente 2,91% do Cerrado são

protegidos na forma de unidades de conservação de proteção integral (AGUIAR; MACHADO; MARINHO-FILHO, 2004; MMA, 2008).

O Cerrado apresenta-se em fragmentos que são de ampla distribuição no Brasil. Atualmente no estado de São Paulo, esses fragmentos totalizam uma área de 21.000 ha, no entanto esses encontram-se de forma bastante isolada (KRONKA et al., 2005).

Os efeitos do desmatamento e da fragmentação ambiental podem reduzir a variabilidade genética das espécies por deriva genética, restringir o fluxo gênico e consequentemente aumentar a endogamia. A endogamia pode conduzir à fixação de alelos deletérios, reduzir o vigor reprodutivo e a adaptabilidade das espécies às mudanças, principalmente as climáticas (VENCOVSKY, 1987; COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001; ZUCCHI et al., 2003; FRANKHAM et al., 2008; CHAVES et al., 2011).

Por isso, há extrema necessidade de que as reservas florestais sejam estabelecidas e manejadas de modo a preservar e manter a variabilidade genética dentro e entre as populações. A partir desse parâmetro torna-se possível estimar como a diversidade genética se distribui e se essa irá permanecer ao longo das gerações, bem como estabelecer critérios sobre a intensidade da coleta de sementes, distância mínima entre as matrizes, área mínima viável para fins de conservação (FRANKHAM et al., 2008).

Estes conhecimentos têm sido gerados pelo emprego de marcadores moleculares principalmente os codominantes, como os microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeat*) (ALVES et al., 2003; GRATTAPAGLIA, 2004). Porém, sem dados sobre a estrutura genética (forma que a variabilidade genética se distribui nas populações), decisões sobre os meios mais efetivos para preservação e uso sustentável do Cerrado não podem ser tomadas.

Nesse contexto, o desenvolvimento de estudos que esclareçam mecanismos sobre o sistema reprodutivo, regeneração e o ciclo de vida das espécies vegetais são necessários, pois boa parte do conhecimento já acumulado sobre recuperação de ecossistemas florestais não se aplica à vegetação de Cerrado (DURIGAN, 2003). Da mesma forma, torna-se imprescindível gerar informações relacionadas com a variabilidade genética dos poucos fragmentos restantes. Para isso, o conhecimento da biologia das espécies, da dinâmica e estrutura das populações são fatores importantes para que se promova uma conservação genética eficiente (KAGEYAMA et al., 2001).

Por isso estudou-se *D. hispida*, uma das espécies arbóreas características do Cerrado, conhecida popularmente como caqui-do-cerrado pertencente à família Ebenaceae, que se

destaca por ser uma das principais famílias endêmicas do Cerrado sendo encontrada em fisionomias campestres de cerrado, cerrado típico e cerradão (DURIGAN et al., 2004).

## 1.1 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver estudos genéticos e demográficos para *Diospyros hispida* no Cerrado da Estação Ecológica de Itirapina e da Floresta Estadual de Assis, ambas as áreas localizadas no estado de São Paulo, de modo a fornecer informações sobre sua estrutura genética e demográfica espacial, as quais irão fornecer subsídios para possíveis ações quanto a sua conservação e manejo.

De forma mais específica, os objetivos são:

- A. Caracterizar a diversidade genética intrapopulacional da espécie por marcadores microssatélites;
- B. Estudar a distribuição espacial dos genótipos das populações;
- C. Verificar o padrão de distribuição espacial da espécie nas duas populações;
- D. Verificar a possível existência de propagação vegetativa na espécie;
- E. Com base em indicadores genéticos, propor recomendações para estratégias de conservação *in situ*.

## 1.2 HIPÓTESES

O presente estudo teve como base as seguintes hipóteses:

- A alta agregação dos indivíduos, em ambas as populações estudadas, pode ser devido à existência de propagação vegetativa na espécie;
- Confirmando a existência da propagação vegetativa e alogamia, haverá um alto número de indivíduos heterozigóticos nas populações;



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Filogeografia e o Bioma Cerrado

A filogeografia vem sendo utilizada para melhor compreensão de vários aspectos da genética de populações e desse modo relacionar os efeitos das glaciações nos atuais padrões de diversidade genética, estrutura genética e distribuição espacial de espécies de plantas e animais (COLLEVATTI et al., 2003; RAMOS et al., 2007; ECKERT et al., 2008; COLLEVATTI et al., 2009).

O período quaternário inclui a época do pleistoceno que foi marcado pelo surgimento dos homínídeos e pelas grandes oscilações climáticas, compreendendo os períodos de glaciação e interglaciação, desse modo, ocorreram sucessivas buscas por locais com condições adequadas (áreas de refúgio) a sobrevivência de muitas espécies vegetais e animais. A instabilidade climática provocou grandes alterações na paisagem da América do Sul, causando mudanças na cobertura vegetal e na distribuição espacial de muitas espécies de plantas, provocando a extinção de algumas populações e simultaneamente a evolução e especiação de outras populações (COLLEVATTI et al., 2003).

Muitas alterações também foram registradas no Brasil, que teve a região central e sudeste caracterizadas por um clima árido, proporcionando a expansão de espécies adaptadas a tais condições (COLLEVATTI et al., 2009 *apud* BEHLING; HOOGHIEMSTA, 2001). Em contrapartida a região sul enfrentou fortes frentes frias combinadas com aumento das chuvas que resultaram na expansão das florestas de araucárias e outras espécies coníferas, essa expansão pode ter reduzido a vegetação típica de cerrado isolando populações, diminuindo o fluxo gênico causando grande divergência entre elas (RAMOS et al., 2007).

Muitos trabalhos indicam que havia uma grande e única área integrando diversas espécies que hoje formam populações divididas e restritas a determinadas faixas geográficas, como foi observado por De Oliveira et al.(1999) através de registros de pólen indicando que a região de cerrado que abrange o rio São Francisco possuía espécies hoje encontradas na Amazônia e Mata Atlântica, sugerindo que um clima mais quente e úmido estava presente naquela região, esse fato pode ter influenciado na retenção de grandes populações com grande diversidade genética (RAMOS et al., 2007).

Dentro desse contexto, Collevatti et al. (2009) *apud* Behling e Hooghiemsta (2001) afirmaram que as regiões sudeste e centro-oeste formavam uma grande e contínua área de Cerrado. Isso foi confirmado também por COLLEVATTI et al. (2003) que estudou diversas

populações de *Caryocar brasilienses* (pequi) e concluíram que a população da Estação Ecológica de Itirapina – Itirapina SP, possui alguns alelos iguais ao da população do Parque Nacional Grandes Sertões Veredas, localizado em Minas Gerais, distantes 800 Km uma da outra. Ramos et al. (2007) encontram resultados semelhantes observando que populações de *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado) no estado de São Paulo possuíam alguns alelos presentes nas populações de Goiás e Mato Grosso e sugeriram também a existência de uma grande população.

Outro importante evento que contribuiu para a divergência entre populações, bem como a menor diversidade de populações periféricas, foi a extinção da megafauna (aproximadamente há 10.000 anos), responsável pelo fluxo gênico, podendo esse fator ter influenciado na estruturação genética de algumas populações, como é o caso de *C. brasilienses* e *H. stigonocarpa* (COLLEVATTI et al., 2003; RAMOS et al., 2007).

Como foi mostrado por diversos autores as regiões de abrangência do Cerrado eram conectadas formando grandes populações, com fluxo gênico e conseqüentemente grande diversidade genética; desse modo pode-se dizer que havia uma única e grande população central que no decorrer de todos esses eventos geológicos e de alterações ambientais, causadas também pela ação humana, resultou em pequenas populações fragmentadas e restritas a uma pequena faixa geográfica, sendo essas chamadas populações periféricas (ECKERT et al., 2009).

As populações periféricas exibem diversos fatores responsáveis por sua menor diversidade genética, sendo o principal deles a baixa taxa de fluxo gênico, isso porque os habitats favoráveis são esparsamente distribuídos; desse modo existe uma reduzida probabilidade de entrada de novos alelos na população tornando-as cada vez mais diferentes geneticamente. Nessas condições a endogamia torna-se cada vez mais freqüente, de modo que em determinado ponto o cruzamento de indivíduos não aparentados torna-se impossível resultando em um reduzido tamanho populacional efetivo (SOULÉ, 1973).

Populações que apresentam essas características podem apresentar ciclo de vida mais curto e estarem mais propensas a sofrer uma redução populacional (gargalo genético) podendo com isso, ser recolonizada por poucos indivíduos, sofrendo assim o efeito fundador (ECKERT et al., 2009); no entanto o fator mais preocupante é que essas populações podem ter seu potencial evolutivo limitado, diminuindo sua resposta adaptativa frente às alterações ambientais. Todas essas questões sobre as populações periféricas e centrais foram avaliadas por Eckert et al. (2009). Os autores realizaram uma extensa revisão bibliográfica e

constatarem que grandes populações (populações centrais) retêm maior tamanho efetivo populacional, maior diversidade genética e maior fluxo gênico quando comparadas com populações periféricas, comprovando a Teoria Centro-Margem, que faz menção a essa diminuição de diversidade genética em populações periféricas comparadas às populações centrais.

Embora os estudos mostrem que os efeitos das glaciações são responsáveis pelas alterações na cobertura vegetal e no modo da distribuição espacial de muitas espécies, gerando populações periféricas, fragmentadas e empobrecidas geneticamente; é necessário ressaltar que o bioma Cerrado que se apresenta bastante fragmentado é extremamente rico em biodiversidade e endemismo e por isso é considerado área prioritária para ações de preservação e conservação. Dados sobre esses aspectos são apresentados abaixo.

## **2.2 O Bioma Cerrado**

O Cerrado, termo comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil, possui aproximadamente 2 milhões km<sup>2</sup>, ocupando cerca de 24% do território nacional (MMA, 2006), é o segundo maior bioma brasileiro sendo superado em área somente pela Amazônia. O Bioma se distribui de forma muito ampla por todo país, mas principalmente na região central brasileira, abrangendo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, o oeste e norte de Minas Gerais, oeste da Bahia e Distrito Federal e áreas consideradas periféricas, que abrangem os Estados do Maranhão, Piauí, Tocantins, São Paulo e Paraná (Figura 1) (IBAMA, 2008).





Figura 1- Área de ocorrência do Bioma Cerrado (cinza)

Fonte: <http://www.wwf.org.br>

O clima do Cerrado é estacional úmido de outubro a março e seco de setembro a fevereiro, com temperatura variando de 22° a 27°C (KLINK; MACHADO, 2005). As chuvas no bioma ocorrem durante o verão e no inverno predomina o clima seco, sendo assim a precipitação média anual é de 1500 mm (BIZERRIL, 2004).

A topografia onde encontra-se o bioma caracteriza-se por ser plana ou suavemente ondulada, aproximadamente 50% da área do Cerrado localiza-se entre 300 a 600m acima do nível do mar (COUTINHO, 2002).

No solo do Cerrado predominam os seguintes tipos: Latossolos, Areia quartzosa e Solos podzólicos. De forma geral apresentam como características em comum a permeabilidade, profundidade, porosidade e baixa capacidade de retenção de água. São predominantemente arenosos, areno-argilosos e raramente argilo-arenosos (COUTINHO, 2002; AGNES et al., 2007).

Há acentuada acidez no solo, isso deve-se a presença de altos teores de alumínio ( $Al^{3+}$ ) tornando-os aluminotóxicos. Esse componente é um constituinte obrigatório no solo, no entanto torna-se altamente solúvel em solos ácidos, desse modo pode causar toxicidade às plantas e interferir na absorção de outros nutrientes e, conseqüentemente, no desenvolvimento da planta (AGNES et al., 2007).

Segundo Lima e Silva (2005), o Cerrado participa das três maiores bacias hidrográficas Sul-americanas, sendo elas: Tocantins-Araguaia, São Francisco e Paraná. Por

conter zonas de planalto no bioma ele possui diversas nascentes de rios, sendo assim o Cerrado é uma importante área de recarga hídrica.

De acordo com Durigan et al. (2004), o Cerrado possui diferentes fisionomias de vegetação sendo elas: campo cerrado, campo limpo, campo sujo, campo úmido, cerrado típico e cerradão, no entanto também encontra-se fisionomias campestres de cerrado (compreende fisionomias abertas de cerrado, em terrenos secos, desde o campo limpo até o campo cerrado), assim como mata ciliar, mata de brejo e tipos florestais ripários. É importante ressaltar que essas fisionomias vegetais apresentam-se em ordem crescente de biomassa, sendo essa diretamente relacionada à fertilidade do solo, o grau de saturação hídrica da camada superficial e subsuperficial do solo e a profundidade do solo (EITEN, 1994).

Por possuir características exclusivas, o Cerrado é considerado um dos 34 “hotspots” mundiais, já que para isso é necessário compreender no mínimo 0,5% de plantas endêmicas em relação à porcentagem global das plantas. Nesse sentido essa é uma região prioritária para o desenvolvimento de pesquisas para a conservação da biodiversidade presente no Bioma (MYERS et al., 2000; CONSERVATION INTERNATIONAL, 2005).

A biodiversidade total do Cerrado foi estimada em 160.000 espécies de plantas, animais e fungos (KLINK; MACHADO, 2005). A flora vascular nativa é de aproximadamente 11.627 espécies, é a mais rica dentre todas as savanas (MENDONÇA et al., 2008), sendo 44% da flora endêmica (MYERS et al., 2000; RATTER et al., 2003).

Essa diversidade, principalmente a de plantas, tem diferente aplicabilidade, pois grande parte delas tem propriedades medicinais, fitoterápicas, alimentícias, bem como a produção de óleos essenciais. Esses recursos têm sido utilizados como fonte de subsistência para as comunidades tradicionais que habitam o Cerrado, sendo assim o bioma apresenta importância ainda mais relevante (SOUZA, 2007; NADER et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Assim como a extensa biodiversidade do Bioma, ele também abriga grande diversidade cultural e social, ainda hoje encontra-se diversas comunidades indígenas habitando o bioma, são elas: Xavantes, Krahôns, remanescentes de quilombos e os Kalungas da Chapada dos Veadeiros (TELLES, 2007). De forma mais precisa, os dados da FUNAI (2009) mostram que aproximadamente 84.000 índios habitam o Bioma.

No entanto essas comunidades estão perdendo seu meio de subsistência devido à atual expansão agrícola no Bioma. As comunidades tradicionais passam a viver em extrema

pobreza tendo como uma das soluções o comércio de plantas nativas que são vendidas como plantas ornamentais (CINCOTA et al., 2000; KLINK; MACHADO, 2005).

O desmatamento no Cerrado chega a 1,5% ou 3 milhões de hectares/ano (MACHADO et al., 2004), mais da metade da sua área total foi transformada em monoculturas e pastos de gramíneas exóticas nos últimos 35 anos. A taxa de desmatamento no Bioma é de 22.000 a 30.000 km<sup>2</sup> por ano, essa taxa é maior do que a taxa atual de desmatamento na Amazônia, isso deve-se pelo menos em parte a legislação ambiental brasileira, na qual a porcentagem a ser mantida como reserva legal é de 20%, já na Amazônia essa proporção é bem maior, cerca de 80% (KLINK ; MACHADO, 2005; TELLES, 2007).

Sano et al. (2008) afirmaram que aproximadamente em 4 décadas cerca de 26% do território compreendido pelo Bioma Cerrado foram transformados em áreas de pastagem e 10% em agricultura. Essas transformações estão sendo cada vez maiores, isso deve-se ao fato da grande expansão de monoculturas, pastagem e conseqüentemente a invasão de gramíneas exóticas, as quais prejudicam a grande biodiversidade existente no bioma, sendo que essas são em sua maioria, dependentes da vegetação dominante. Nesse sentido, isso tem causado mudanças nos estoques de carbono, já que os fluxos de CO<sub>2</sub> dos pastos para a atmosfera são mais rápidos e mais sazonalmente variáveis quando comparados com o Cerrado nativo (KLINK ; MACHADO, 2005).

Outra ameaça aos “hotspots”, a nível global, é a ocupação humana de forma desordenada. Segundo Cincota et al. (2000) em 1995 mais de 1.1 bilhões de pessoas (aproximadamente 20% da população mundial) estavam vivendo dentro dos hotspots.

O Cerrado possui apenas 7,44% de sua área protegida por unidades de conservação, federais, estaduais e municipais, sendo que aproximadamente 2,91% do Cerrado são protegidos na forma de unidades de conservação de proteção integral (MMA, 2008). No entanto, Machado et al. (2004) afirmaram que cerca de 20% das espécies endêmicas e ameaçadas localizam-se fora dessas unidades de conservação.

Atualmente no estado de São Paulo, o Bioma apresenta-se sob a forma fragmentos que totalizam uma área de 21.000 ha (Figura 2), no entanto esses apresentam-se de forma bastante isolada, sendo que o principal responsável desse cenário é dentre os itens citados acima, o plantio da cana-de-açúcar (KRONKA et al., 2005, DURIGAN et al., 2007).

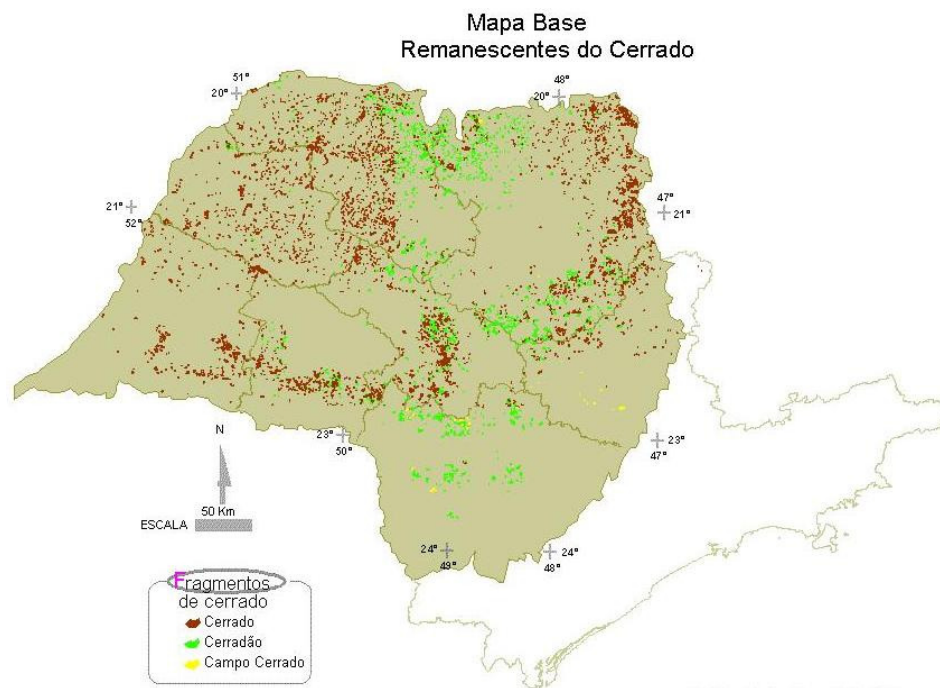


Figura 2 - Fragmentos de Cerrado no Estado de São Paulo  
Fonte: [http://www.biota.org.br/info/saopaulo/remam\\_cerrado](http://www.biota.org.br/info/saopaulo/remam_cerrado)

Os efeitos do desmatamento e da fragmentação ambiental podem reduzir a variabilidade genética das espécies por deriva genética, restringir o fluxo gênico e consequentemente aumentar a endogamia. A endogamia pode conduzir à fixação de alelos deletérios, a redução do vigor reprodutivo e da adaptabilidade das espécies às mudanças, principalmente as climáticas (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001; VENCOVSKY, 1987; ZUCCHI et al., 2003; FRANKHAM et al., 2008).

### 2.3 A Família Ebenaceae e o gênero *Diospyros* Dalechamp ex Linnaeus.

A ordem Ebenales possui as seguintes famílias: Sapotaceae, Styracaceae, Sarcospermataceae, Symplocaceae, Lissocarpaceae e Ebenaceae; essa última possui cerca de 500-600 espécies, com ampla distribuição, sendo que as principais localizações são: Ásia, Madagascar, África tropical e América do Sul (WALLNÖFER, 2001; SOUZA; LORENZI, 2008).

De modo geral a família Ebenaceae possui folhas simples, alternas, nectários extraflorais na superfície abaxial das folhas, inflorescências axilares e flores actinomorfas (SANTOS; SANO, 2009).

Em 1587 o autor Dalechamp descreveu o gênero *Diospyros*, esse gênero foi criado a partir da espécie *Diospyros lotus*, que significa “fruto dos deuses”. O gênero foi apresentado por Linnaeus em sua obra “*Genera Plantarum*” em 1754, no entanto ainda hoje existem

alguns autores que trabalham com o gênero segundo Dalechamp e outros segundo Linnaeus, porém a forma correta de citar o autor é a seguinte: Dalechamp ex Linnaeus, já que Dalechamp foi o primeiro a descrever o gênero e Linnaeus cita Dalechamp como autor em sua obra de 1754 (LOPES, 1999).

*Diospyros* é o gênero numericamente mais significativo da família, está representado no Brasil por aproximadamente 35 espécies, além de ter ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais (Barroso, 1978).

O fruto é do tipo baga, contém tanino, uma substância responsável pelo sabor adstringente que torna-se mais sutil quando os frutos amadurecem, em raros casos (com exceção dos cultivares) desaparecem totalmente. Em algumas espécies os frutos podem ser tóxicos quando ingeridos ainda cru e por isso em alguns países são utilizados para a captura de peixes. O número de sementes é extremamente variável, em geral são achatadas lateralmente, irregulares ou raramente arredondadas transversalmente. A dispersão de sementes ocorre predominantemente de forma zoocórica, tendo como dispersores diversos tipos de pássaros, macacos e morcegos (WALLNÖFER, 2001).

As espécies da família possuem diversos compostos químicos dentre esses destaca-se as naftoquinonas, que podem ocorrer em muitos órgãos especialmente na casca dos frutos e tem propriedades ativas contra fungos, bactérias, insetos, cupins e vermes (WALLNÖFER, 2001; CORVALAN; FERREIRA, 2006).

Do mesmo modo, essas espécies têm sido amplamente utilizadas na fitoterapia para o tratamento da hanseníase, úlcera, distúrbios da menstruação, gonorréia, transtornos intestinais e como antibióticos (CORVALAN; FERREIRA, 2006).

As espécies pertencentes ao gênero têm grande importância econômica, sendo utilizados para esse fim seu fruto e madeira. Dentre as espécies pode-se destacar *Diospyros kaki*, já que é produzida em ampla escala pelo Japão, China e Coréia, e em menor escala por outros países; seu fruto pode ser ingerido fresco ou seco, sendo uma rica fonte de açúcar. A madeira está entre os materiais exóticos que foram valorizados, são utilizados na fabricação de instrumentos musicais, na marcenaria, como lâminas decorativas para móveis e finalmente para decoração de interiores. Atualmente algumas espécies estão sendo altamente exploradas e por esse motivo podem se tornar extintas na natureza (WALLNÖFER, 2001).

## 2.4 *Diospyros hispida* Alph. D.C.

*Diospyros hispida* Alph. D.C., popularmente conhecida como caqui-do-cerrado, fruto-de-boi e olho-de-boi é uma espécie pertencente à família Ebenaceae (DURIGAN et al., 2004). *D. hispida* é uma espécie decídua (perdem totalmente suas folhas numa determinada época do ano), heliófita (necessita de intensa luminosidade) e xerófito (possui adaptações para sobreviver a intensas secas) (LORENZI, 1998).

Ocorre em fisionomias campestres de cerrado, cerrado típico e cerradão, compreende os estados: Maranhão, Piauí, Ceará, Tocantins, Bahia, Mato Grosso, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (RATTER et al., 2003; DURIGAN et al., 2004) (Figura 3).

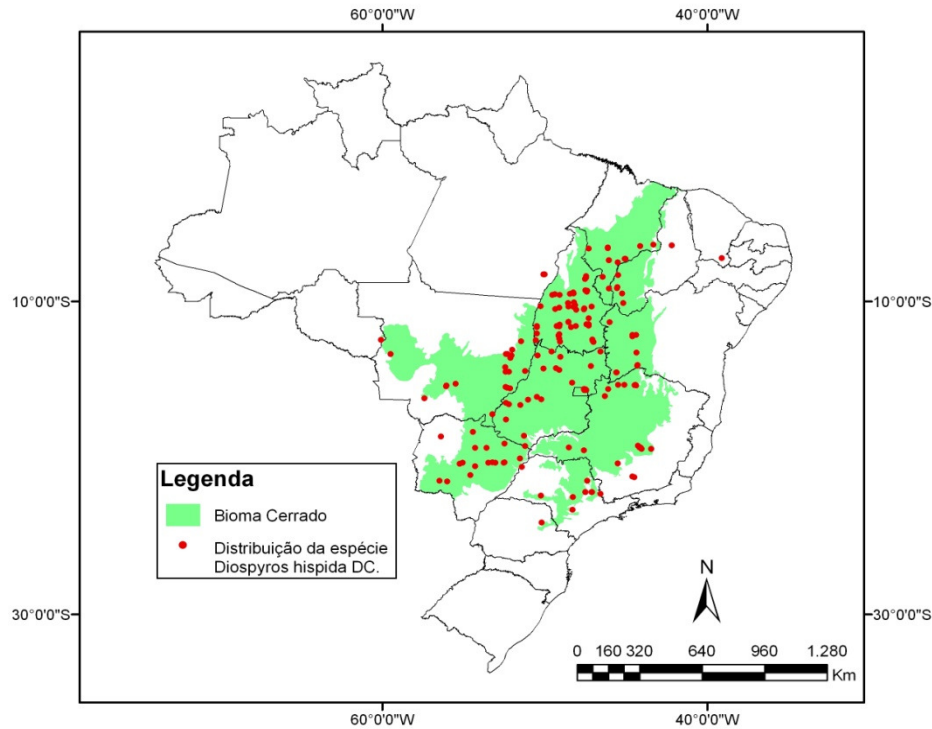


Figura 3 - Distribuição natural de *D. hispida* em 171 localidades entre os 360 levantamentos realizados no Cerrado sentindo amplo em todo o Bioma Cerrado

Fonte: RATTER et al., 2003

A árvore (Figura 4a) desta espécie é pequena e tortuosa com copa densa, apresenta casca irregularmente fendilhada (Figura 4e). A madeira (Figura 4f) é moderadamente pesada (densidade  $0,62 \text{ g/cm}^3$ ), macia, pouco resistente e muito sujeita ao apodrecimento. Por possuir pequenas dimensões disponíveis é empregada apenas localmente para obras internas em construções rústicas, cabo de ferramentas agrícolas, cangas de boi e para lenha e carvão (LORENZI, 1998).

As folhas (Figura 4b) são simples, alternas, coriáceas, ovais, ovado-elípticas, ou elípticas, base obtusa, arredondada ou aguda, ápice agudo, arredondado ou cuspiado, cerca de 15 cm de comprimento e 10 cm de largura (às vezes muito maiores), ambas faces recobertas por densa pilosidade acobreada nas folhas novas e quando adultas a face superior é lustrosa, a nervação terciária é impressa na face superior do limbo (LORENZI, 1998; DURIGAN et al., 2004).

A partir das folhas de *D. hispida* é possível extrair extratos, os quais possuem atividade antibacteriana como foi confirmado por Corvalan e Ferreira (2006) que estudaram amostras de 33 microrganismos isolados de úlceras por pressão. Desses somente cinco apresentaram halo de inibição de crescimento, indicando o alto potencial bactericida da espécie, sendo essa uma importante característica da espécie, porque reforça a importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos.

*D. hispida* é uma espécie dióica por isso, as flores femininas são separadas das flores masculinas (Figura 4b), sua antese (abertura das flores) ocorre durante a noite, elas são verdes, sésseis, axilares, isoladas ou formando grupos pequenos. São polinizadas por pequenos lepidópteros noturnos. A floração ocorre de agosto a novembro (LORENZI, 1998; WALLNÖFER, 2001; DURIGAN et al. 2004).

Seu fruto (Figura 4c) é uma baga séssil, globosa, verde e pilosa com cerca de 6 cm de diâmetro, contendo de 6 a 8 sementes (Figura 4d). Os frutos (Figura 5) são comestíveis e muito apreciados pela fauna silvestre, sendo assim pode ser extremamente útil nos plantios de restauração de áreas degradadas. A maturação dos frutos ocorre de dezembro a março (LORENZI, 1998; DURIGAN et al., 2004).



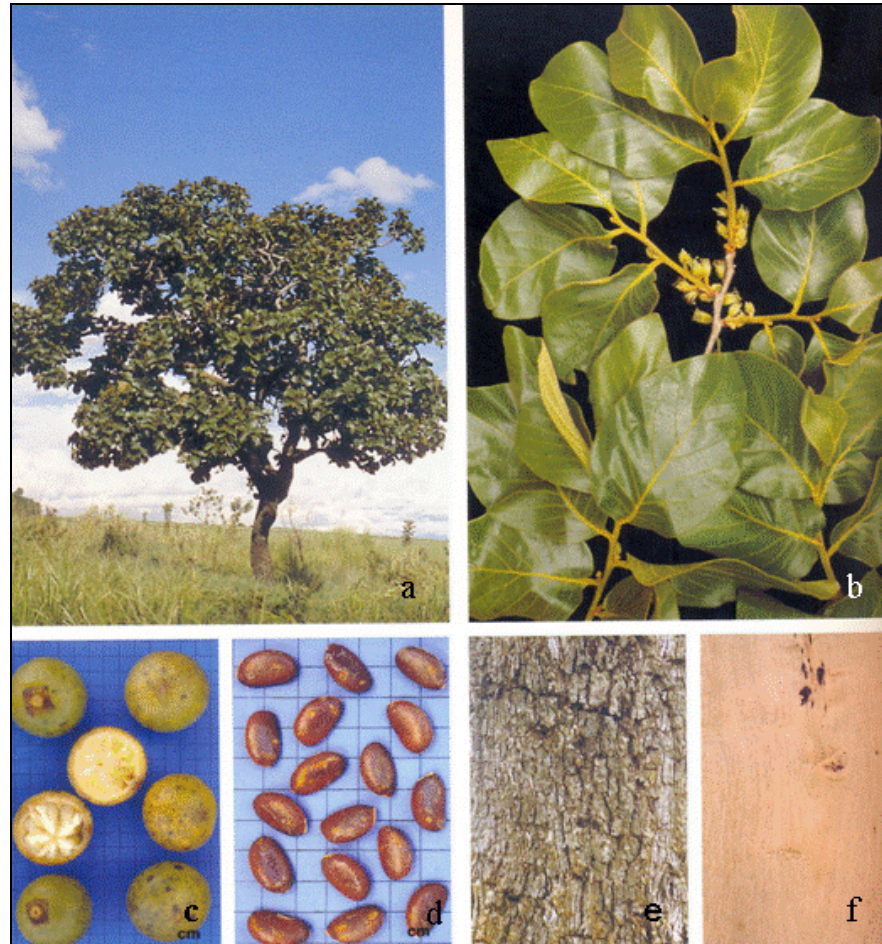


Figura 4 - Indivíduo adulto (a), folhas e flores (b), frutos (c), sementes (d), tronco (e) e madeira (f) de *D. hispida*  
 Fonte: LORENZI, 1998



Figura 5 – Morcego da espécie *Platyrrhinus lineatus* alimentando-se do fruto de *D. hispida*  
 Fonte: [http://www.casadosmorcegos.org/index\\_port.htm](http://www.casadosmorcegos.org/index_port.htm)



Existem poucos trabalhos sobre *D. hispida*, na maioria das vezes a espécie aparece em estudos de levantamentos florísticos, já que tem ampla distribuição pelo Cerrado, no entanto, alguns estudos envolvendo aspectos ecológicos desta espécie podem ser citados.

O trabalho desenvolvido por Souza et al. (2006) estudou a influência de insetos galhadores sobre a área foliar de *D. hispida*, já que a espécie é hospedeira de alguns dípteros e coleópteros que colocam seus ovos em ramos ou folhas da espécie causando na maioria das vezes, uma reação de hipersensibilidade. Os autores observaram que aproximadamente 50% das tentativas dos insetos em induzir galhas foliares foram resultadas na perda desses ovos, ou seja, na perda de futuros indivíduos, no entanto, quando os mesmos obtinham sucesso os ramos parasitados pelos insetos tinham folhas com área superficial 50% menores que as folhas de ramos saudáveis. Esse último dado se mostra preocupante, já que as plantas parasitadas diminuem seu desempenho, pois reduzem a formação de flores, frutos, sementes e a produção de biomassa.

O trabalho realizado por Gatti et al. (2007) analisou o potencial alelopático do extrato retirado das folhas de *D. hispida*. Esses autores observaram que ao utilizar o extrato para irrigar aquênios de alface e sementes de gergelim, a velocidade de germinação dessas espécies diminuía quando comparado ao controle; esse fato é extremamente importante, visto que a alelopatia pode influenciar a dominância e sucessão de plantas e a formação de comunidades. No Cerrado *D. hispida* pode apresentar esse efeito alelopático em reflexo ao ambiente que apresenta estresse hídrico e a incidência de fogo, os quais podem estimular a liberação de compostos químicos pela planta, sendo esse um importante mecanismo ecológico da espécie.

No trabalho realizado por Ibanes et al. (2008 a,b) na Estação Ecológica de Itirapina (EEI), Itirapina, SP, analisou-se uma população de *D. hispida* numa parcela de 0,675ha (45x150m) e foram encontrados 304 indivíduos, que apresentaram alto e significativo índice de agregação ( $R=0,381$ ) e distância média do vizinho mais próximo (DMVP) de 1,37m. Os indivíduos apresentaram um padrão de distribuição demográfica do tipo “J” invertido, que segundo Walter (1997), sugere um equilíbrio entre o crescimento e a mortalidade dos indivíduos, encontrado quando a comunidade está em regeneração, este processo é geralmente encontrado no cerrado, devido à ocorrência de incêndio. A análise realizada dentro de cada classe diamétrica revelou uma tendência de redução na agregação de indivíduos de até 5 cm de diâmetro, havendo ausência total de agregação dos indivíduos com classe diamétrica maior que 5 cm, sendo que a esse fato pode ser atribuído a disponibilidade de recursos como nutrientes e água.

## 2.5 Conseqüências genéticas da fragmentação ambiental

O crescimento da população humana no decorrer das últimas décadas aumentou exponencialmente, tendo como principal conseqüência as alterações florestais, que substituem florestas naturais por áreas de agricultura, pastagem e habitação. Essas modificações afetam a integridade dos ecossistemas, resultando em florestas fragmentadas e com limitações funcionais (CINCOTTA et al., 2000; YOUNG; BOYLE, 2000).

A mudança da comunidade florestal tem sido observada principalmente quando há recente criação de bordas na floresta, causando o “efeito de borda”. O efeito de borda refere-se a alterações das condições abióticas e bióticas que ocorrem na margem de um ecossistema e dentro de ecossistemas contíguos. As conseqüências desse efeito podem ser diretas, que incluem danos estruturais à vegetação, destruição do solo, mudança no ciclo de nutrientes e decomposição, mudanças na dispersão de sementes e pólen, assim como alterações na evaporação. Os danos indiretos têm efeitos sobre os padrões de crescimento, regeneração, reprodução e mortalidade das plantas (LIMA-RIBEIRO, 2008).

Nesse contexto a fragmentação exerce drásticos efeitos: redução do número de indivíduos, redução do tamanho populacional e isolamento espacial, já que as populações ficam restritas aos pequenos remanescentes florestais. Esses efeitos geram fortes conseqüências genéticas para esses indivíduos, sendo estas: alterações nos sistemas de cruzamento, fluxo gênico (via pólen e semente), seleção que determinam os níveis de diversidade mantida dentro de populações, perda de diversidade genética na população, aumento da endogamia e mudanças na estrutura interpopulacional desses indivíduos, resultando em longo prazo, na extinção (YOUNG; BOYLE, 2000).

Populações pequenas e isoladas dificultam a dispersão de pólen e sementes, ou seja, o fluxo gênico é diminuído, nesse sentido a endogamia torna-se inevitável, visto que essas populações geralmente têm baixo número de fundadores. A endogamia leva a reduções na heterozigosidade e no vigor reprodutivo. A perda do vigor reprodutivo quando conseqüência da endogamia é chamada de depressão endogâmica. As principais conseqüências da endogamia é que os homozigotos para alelos recessivos deletérios tornam-se mais freqüentes do que em populações que se reproduzem ao acaso e ocorre a diminuição da capacidade de adaptabilidade frente as mudanças estocásticas, além da inevitável redução da diversidade genética (REED, 2005; FRANKHAN et al., 2008).

A fragmentação causa redução no número de alelos que está associado à diminuição do tamanho populacional (CASCANTE et al., 2002; WHITE, BOSHIER, POWELL, 1999).

Oscilações populacionais resultam na deriva genética que tem como consequência a fixação de alelos, situação na qual todos os indivíduos tornam-se homozigotos, ou seja, há perda da diversidade genética porque as populações têm redução no número de alelos e conseqüente redução populacional (HANSON et al., 2008; MAYER et al., 2009).

## **2.6 Sistemas reprodutivos em espécies do Cerrado.**

O sistema reprodutivo de espécies vegetais pode ocorrer de forma sexuada e assexuada. A reprodução sexuada ocorre basicamente por meio do cruzamento que envolve a união de gametas; esse mecanismo reprodutivo é responsável pela diminuição da divergência genética entre populações e pela recombinação da variabilidade genética a cada geração. Esses fatores favorecem a dispersão dos genes via pólen a mais longas distâncias quando comparadas a espécies com sistema reprodutivo assexuado (SEBBENN, 2006). A reprodução assexuada em plantas pode ocorrer de duas formas diferentes: reprodução vegetativa por raízes e por agamospermia. Em plantas clonais, a reprodução vegetativa produz novos rametes por brotação de raízes, rizomas, caules, órgãos de armazenamento, tais como tubérculos ou (mais raramente) folhas e inflorescências. Já a agamospermia é a produção partenogênica de sementes, também conhecida como apomixia, que consiste na produção de sementes sem que ocorra a polinização, sendo, portanto, clones da planta-mãe (RICHARDS, 1997; SILVERTOWN, 2008).

A reprodução pode apresentar grande variação entre espécies e entre diferentes populações de uma mesma espécie, essas variações podem ser influenciadas por fatores ambientais e pelas próprias características genéticas das populações (SEBBENN, 2006), no entanto muitos trabalhos mostram que espécies vegetais de florestas tropicais são preferencialmente alógamas. Dentre esses trabalhos um dos clássicos e mais completos é o de Bawa (1974) que observou 34 espécies da floresta tropical da Costa Rica e concluiu que, dentre essas, 27 eram auto-incompatíveis e sete eram auto-compatíveis; outro trabalho nessa mesma linha foi o de Bawa et al. (1985), onde os autores indicaram dentre as espécies estudadas na floresta tropical da América Central que 65% eram hermafroditas, 11% eram monóicas e 23% eram dióicas, mostrando a importância do cruzamento para essas espécies arbóreas tropicais.

Assim como nas florestas tropicais, trabalhos com espécies do Cerrado mostram que elas também são preferencialmente alógamas, porém algumas espécies podem apresentar

capacidade para reproduzir-se de forma sexuada e assexuada (HONNAY, BOSSUYT, 2005). Dentre esses trabalhos podem-se mencionar Costa (1988) que estudou três espécies típicas do Cerrado: *Vochysia tucanorum*, *Xylopia aromatica* e *Anadenanthera falcata*, embora o autor citado tenha concluído que o sistema reprodutivo dessas espécies é alogâmico, ele observou também que *V. tucanorum* produziu uma pequena quantidade de frutos por autogamia e atribuiu esse fato como uma estratégia alternativa da espécie. Tarazi (2009) estudou uma população de *Copaifera langsdorffii* e concluiu que a espécie possui um sistema misto de reprodução, porém com um predomínio de alogamia. Silva (2010) estudou oito populações de *Tabebuia aurea* e concluiu que a espécie se reproduz exclusivamente por meio de cruzamentos, podendo apresentar mecanismos de auto-incompatibilidade. Moreno (2009) estudou duas populações de *Hymenaea stigonocarpa* e observou que a população de Assis apresentou reprodução exclusivamente por cruzamentos, já a população de Itirapina apresentou propagação vegetativa e concluiu que essa divergência no sistema reprodutivo pode ser em decorrência da ação do fogo que é mais comum em Itirapina.

Embora tenham sido apresentados aqui trabalhos mostrando a predominância da reprodução sexuada em várias espécies do Cerrado, existem também várias evidências que indicam a ampla distribuição e ocorrência da reprodução vegetativa nas savanas. Nas estruturas subterrâneas de plantas do Cerrado, a reprodução vegetativa ocorre quando um indivíduo originado de um zigoto formado sexualmente (genete) cresce lateralmente, formando novos indivíduos separados apenas espacialmente, mas que num determinado momento se tornarão fisiologicamente independentes (rametes) (JAMES, 1984).

Espécies com propagação clonal são capazes de adotar diferentes estratégias para resistirem a situações ambientais contrastantes, podendo aumentar a aquisição de recursos desenvolvendo um elaborado sistema de enraizamento, onde as raízes envolvem a integração fisiológica com os rametes, permitindo a captação de recursos e aumentando sua ocupação espacial, a fim de alcançar ambientes favoráveis (CAIN et al., 1996). Em geral a resistência dessas espécies, em longo prazo, depende de um equilíbrio entre a sobrevivência de genetetes, o crescimento clonal após o estabelecimento da população e o recrutamento de novos indivíduos através da reprodução sexuada; esse recrutamento confere um grande gasto energético na produção de sementes, no entanto possibilita a colonização de novos ambientes (ERIKSSON, 1993; JACQUEMYN et al., 2006).

Embora a propagação vegetativa apresente algumas desvantagens, plantas que se reproduzem assexuadamente têm algumas vantagens sobre as plantas que se reproduzem

sexuadamente: os gastos energéticos são menores; o que é interessante nas espécies vegetais do Cerrado, pois esta economia de energia pode ser empregada para as plantas atingirem um tamanho adequado em pouco tempo, tornando-as mais resistentes aos estresses ambientais, como o fogo, ou ainda facilitando a colonização de áreas onde o solo pode apresentar restrições edáficas para a germinação de sementes (HOFFMANN, 1998; SILVERTOWN, 2008).

Apesar de um grande número de espécies apresentarem clonalidade em uma ampla variedade de táxons e habitats, teorias e modelos evolutivos são baseados principalmente na singularidade genética de indivíduos. Isto se deve, provavelmente, porque estudos ecológicos e evolutivos de plantas clonais eram dissuadidos pela dificuldade em discriminar genetes e rametes (ARNAUD-HAOND et al., 2007b).

Nesse sentido, a crescente demanda de trabalhos publicados nessa área, especificamente com plantas clonais, foi constatada por Arnaud-Haond et al. (2007a), por meio de uma pesquisa bibliográfica no ISI Web of Knowledge. Os mesmos autores constataram que 83% dos artigos publicados ao longo das últimas três décadas (1973-2003) foram produzidos somente depois do ano de 1995, com um aumento abrupto a partir de 1998, coincidindo com o início do uso de marcadores microssatélites, marcadores estes ainda considerados os mais poderosos disponíveis para essa finalidade.

## **2.7 Marcadores microssatélites**

Os microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas) foram descritos pela primeira vez no ano de 1989 por três diferentes grupos de pesquisadores: Litt; Luty (1989); Weber; May (1989); Tautz (1989). Esses marcadores são repetições de pequenas sequências de um a seis nucleotídeos em série (*tandem*) e que podem ser encontrados amplamente distribuídos, de forma aleatória, pelo genoma da maior parte dos eucariotos, em regiões codificantes de proteínas ou em regiões não codificantes, sendo rara sua ocorrência em regiões codificadoras de proteínas, evitando assim que essas regiões sejam alteradas e conseqüentemente tendo a perda da sua funcionalidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TÓTH et al., 2000; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002; VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005).

Os microssatélites podem ser homozigotos se possuem o mesmo número de repetições nos cromossomos homólogos, ou heterozigotos se possuem número de repetições diferentes

em cada um dos cromossomos homólogos, onde cada segmento diferente de DNA representa um alelo daquele loco específico (ALVES et al., 2003). Os SSR podem ainda ser classificados de acordo com o tipo de repetição em perfeitos, imperfeitos, interruptos ou compostos. Uma seqüência perfeita é aquela que não é interrompida por qualquer base que não seja o motivo da repetição (ex. TATATATATATATATA). Na seqüência imperfeita, há uma interrupção de um par de bases que não pertence ao motivo (ex. TATATATACTTATATA); já no interrupto, há uma pequena seqüência dentro do motivo (ex. TATATACCGTGTTATATATATA). Um microsatélite composto contém duas seqüências de repetição adjacentes diferentes (ex. GTGTGTGTTATATATA) (OLIVEIRA et al., 2006).

Esses marcadores moleculares são considerados neutros por não sofrerem nenhum tipo de pressão seletiva, mas a significância funcional de alguns microsatélites tem sido demonstrada, como é o caso da Doença de Huntington, causada por um aumento no motivo CAG, presente no cromossomo quatro (MOXON; WILLS, 1999). Além de algumas doenças os microsatélites podem estar envolvidos na organização da cromatina, na regulação de processos metabólicos do DNA e na regulação da expressão de alguns genes (LI et al., 2002).

Mesmo sendo utilizados em uma ampla variedade de estudos genéticos, a dinâmica mutacional dos microsatélites ainda não é bem compreendida, no entanto, sabe-se que a taxa mutacional desses marcadores é muito maior do que em outras partes do genoma, variando de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  nucleotídeos por loco por geração (PINTO, et al., 2001). Em geral as mutações nos microsatélites são causadas pela “*slippage*” (deslizamento) da DNA polimerase (TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994) ou pelo “*crossing-over*” (EISEN, 1999).

Durante a replicação ou reparo do DNA a “*slippage*” pode ocorrer em ambos os filamentos de DNA resultando num erro de pares de base, formando alelos com uma repetição a menos se a “*slippage*” ocorre na “fita-mãe” e alelos com uma repetição a mais se a “*slippage*” ocorrer na fita complementar. Quando a mutação no microsatélite ocorre por meio do “*crossing-over*” (permuta desigual) podem existir drásticas mudanças como perda ou ganho de um grande número de repetições. Isto ocorre porque podem formar alças durante a o cruzamento das cromátides irmãs, o que significa que partes com comprimentos diferentes serão trocadas e um cromossomo receberá um fragmento contendo mais repetições e o cromossomo homólogo receberá fragmentos com menor tamanho e conseqüentemente com menores repetições (OLIVEIRA et al., 2006).

Apesar da alta mutabilidade desses marcadores as regiões que flanqueiam os SSR geralmente são preservadas entre indivíduos da mesma espécie, possibilitando o

desenvolvimento e seleção de *primers* específicos que amplificam (geram cópias múltiplas) os fragmentos contendo DNA repetitivo em todos os genótipos por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo dos marcadores microssatélites exibido por meio da PCR pode ser revelado em géis de poliacrilamida e a interpretação desses géis é simples, pois cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. Como cada loco é definido por um par de iniciadores (*forward/reverse*), nos heterozigotos há duas bandas enquanto nos homozigotos há só uma banda. Entretanto, a amplificação de repetições de dinucleotídeos tem se mostrado vulnerável à formação das chamadas bandas *stutter*. São também denominadas de bandas sombra ou produtos do deslize da DNA polimerase e diferem em tamanho do alelo principal por um número a mais ou a menos de repetições. No caso dos locos de repetições dinucleotídicas, a banda *stutter* é menor (em dois nucleotídeos) que a banda correspondente ao alelo principal. Esse padrão de multibanda dificulta a interpretação dos locos de repetições dinucleotídicas. Em geral, a amplificação de locos com repetições tetranucleotídicas é de interpretação mais fácil (PINTO et al., 2001). Quando utilizado o seqüenciador automático para realização das eletroforeses, a detecção e a estimativa do tamanho dos alelos (apresentados em forma de picos) de cada indivíduo são realizadas com o uso de programas computacionais como o GeneScan (APPLIED BIOSYSTEMS versão 3.7, 2001) e o Genotyper (APPLIED BIOSYSTEMS versão 2.0, 1996) (RAPOSO, 2007).

A presença de alelos nulos pode levar a interpretações errôneas dos géis, pois esses alelos ocorrem devido a uma mutação na seqüência iniciadora do loco e falham na amplificação das reações de PCR e deste modo, indivíduos heterozigotos que possuem alelo nulo serão considerados como homozigotos, diminuindo a variabilidade genética observada em populações avaliadas por locos microssatélites. A ocorrência desses alelos pode ser detectada utilizando o teste de freqüências observadas nas proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ou verificar se alguns indivíduos falham repetidamente na amplificação dos alelos em um loco enquanto outros locos amplificam normalmente, ou ainda pela observação e comparação direta dos genótipos maternos com os de suas progênies (SELKOE; TOONEN, 2006).

Outro fator que pode conduzir a interpretação errônea dos géis e a homoplasia, que é o resultado de uma mudança evolutiva adaptativa que faz com que indivíduos independentes adquiram o mesmo caráter, no entanto eles não originam de um ancestral comum, sendo

assim, a homoplasia pode causar distorções nas estimativas a respeito da estrutura genética de populações e filogenia de espécies (ESTOUP; JARNE; CORNUET, 2002; OLIVEIRA et al.; 2006).

Os microssatélites por serem marcadores moleculares codominantes têm sido cada vez mais utilizados como uma ferramenta eficaz para a compreensão de muitos campos da genética, como a estrutura genética de populações, fluxo gênico, análise de paternidade, viabilidade de populações, além de permitir a quantificação dos efeitos da fragmentação de habitats e estabelecer estratégias para a conservação de espécies (LEMES et al., 2003). Contudo, pode existir dificuldade na interpretação dos SSR, pois o desenvolvimento de métodos biométricos não tem acompanhado o progresso na aplicação destes marcadores, sendo necessário obter informações sobre a evolução das seqüências repetitivas, que constituem microssatélites para formular modelos que abordem as características desses marcadores (OLIVEIRA et al., 2006).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites para uma nova espécie exige isolamento, clonagem, seqüenciamento e caracterização dos locos. Vários métodos estão disponíveis para melhorar o enriquecimento de bibliotecas genômica de microssatélites, mas os custos ainda são elevados (ZANE et al., 2002, SELKOE; TOONEN, 2006). Nesse sentido o protocolo desenvolvido por Billotte et al. (1999) se destaca por sua eficiência e relativa baixa demanda de recursos.

Entretanto a conservação das regiões flanqueadoras dos microssatélites possibilita a utilização de iniciadores específicos em outras espécies pertencentes a um mesmo gênero ou entre gêneros de uma mesma família (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, ZUCCHI et al., 2002). A necessidade de uma proximidade filogenética é um fator que garante o êxito na transferência de *primers*, no entanto ela pode ser afetada por fatores como o tamanho e complexidade do genoma em questão e se os microssatélites pertencem a regiões codificantes (OLIVEIRA et al., 2006).

A transferabilidade é um fator importante na facilitação de estudos com marcadores microssatélites, pois em geral seu custo é reduzido, quando comparado ao desenvolvimento de marcadores específicos. Essa característica permitiu a realização de inúmeros estudos, dentre os quais pode-se destacar os trabalhos com espécies do Cerrado: Zucchi et al. (2002) de *Eucalyptus spp* para *Eugenia dysenterica*; Martins et al. (2006) de *Capsicum spp* para *Solanum lycocarpum* e Ciampi et al. (2008) de *Hymenaea courbaril* para *Hymenaea stigonocarpa*, entre outros.



## 2.8 Estrutura Genética

O termo estrutura genética tem sido utilizado de várias maneiras, entre as diversas definições, uma das mais abrangentes e ao mesmo tempo mais sucintas foi dada por Loveless e Hamrick (1984) como: distribuição não casual de alelos e genótipos no espaço e no tempo. A estrutura genética pode ser influenciada através dos sistemas de reprodução, dispersão, polinização além da distribuição espacial das espécies, gerando um maior grau de parentesco dentro dos grupos do que entre os grupos afetando assim a diversidade genética das espécies. A estruturação pode manifestar-se em diferentes escalas como: populações e subpopulações (macroescala) ou intrapopulacional (microescala), esses casos tratam-se de estrutura genética espacial (EGE) (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Em macroescala as subdivisões das populações são geralmente determinadas pela fragmentação natural ou antrópica, resultando em ambientes completamente heterogêneos, onde os indivíduos da população ou subpopulação se distribuem espacialmente em locais mais aptos a sua sobrevivência (FISCHER; LINDENMAYER, 2007). Algumas populações podem tornar-se agregadas, com alto grau de conectividade, baixo risco de extinção dentro do agregado havendo um alto nível de dispersão dos alelos entre as subpopulações. Desse modo espera-se baixa divergência genética entre as subpopulações e ausência de EGE. Outras populações podem tornar-se parcialmente isoladas, sendo assim espera-se um baixo fluxo gênico entre subpopulações, alta divergência genética e EGE como resultado do isolamento genético através da distância. Há ainda populações que tornam-se completamente isoladas e pela inexistência de imigração e dispersão de alelos entre subpopulações, espera-se alta divergência genética, além dos efeitos causados pela deriva genética. A divergência genética entre as populações isoladas ocorre em decorrência da amplitude da deriva genética dentro das subpopulações como resultado do reduzido tamanho populacional e como resultado do isolamento pela distância (MAYER; SCHIEGG; PASINELLI, 2009).

Para melhor compreensão da EGE intrapopulacional, alguns fatores necessitam ser mencionados como o número, a densidade, a distribuição e o parentesco de indivíduos genitores, a escala espacial da dispersão dos alelos, o comportamento de forrageamento dos vetores de polinização que pode favorecer o cruzamento entre indivíduos aparentados. A EGE também aumenta diante da presença da colonização de uma área por poucos genitores, pois esses tendem a deixar um maior número de alelos idênticos na população (GUSSON et al., 2005; GAINO et al., 2010).

A presença de EGE pode afetar estimativas de diversidade genética e por isso tem importante aplicação nos programas de conservação. O conhecimento da EGE auxilia nas estratégias de coleta de sementes para programas de conservação, pois evita a coleta de genótipos semelhantes numa população, no manejo de populações naturais nas quais os padrões de exploração tendem a afetar a diversidade genética. É importante ressaltar que, caso a EGE seja ignorada, pode haver interpretação errônea da endogamia e da seleção de genótipos, pois a EGE usualmente resulta no efeito Wahlund (redução da heterozigosidade causada pela estruturação). O conhecimento da EGE pode melhorar a eficiência da amostragem para maximizar a diversidade gênica ou minimizar os cruzamentos endogâmicos (EPPERSON, 1990; GAINO et al., 2010).

Há várias técnicas estatísticas que permitem caracterizar a estrutura genética das populações naturais, por meio de marcadores moleculares ou caracteres quantitativos. Com marcadores moleculares codominantes é possível utilizar três metodologias sem a necessidade de estimá-los por modelos restritos: estatísticas  $F$  de Wright (WRIGHT, 1965); análise da variância das frequências gênicas (COCKERHAM, 1969) e análise da diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973). As três abordagens procuram verificar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações, ou seja, são métodos utilizados para macroescala. Para a detecção de EGE intrapopulacional, geralmente são utilizadas as estimativas dos coeficientes de coancestria de Cockerham ( $\hat{\sigma}$ ), (COCKERHAM, 1969; VENCOVSKY, 1992; WEIR, 1996).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Áreas de estudo e amostragem

A pesquisa foi realizada em duas áreas de Cerrado do Estado de São Paulo, abrangendo os municípios de Itirapina e Assis (Figura 6). As áreas localizam-se na Estação Ecológica de Itirapina e Floresta Estadual de Assis, respectivamente, administradas pelo Instituto Florestal do Estado de São Paulo. A distância entre as duas áreas de coleta é de 266 km. A escolha destas áreas buscou avaliar o grau de conservação genética de populações naturais de *D. hispida* em alguns dos últimos remanescentes protegidos de Cerrado do Estado de São Paulo com fisionomias e históricos contrastantes. A caracterização das fisionomias da vegetação das áreas em estudo se baseou na classificação apresentada por Durigan et al. (2004).

O levantamento de possíveis populações de *D. hispida* em Unidades de Conservação no Estado de São Paulo foi realizado, a partir de busca bibliográfica e de levantamentos florísticos. A posterior localização dos indivíduos de *D. hispida* se deu por meio de viagens a campo e comunicação pessoal com técnicos e pesquisadores das áreas de estudo.

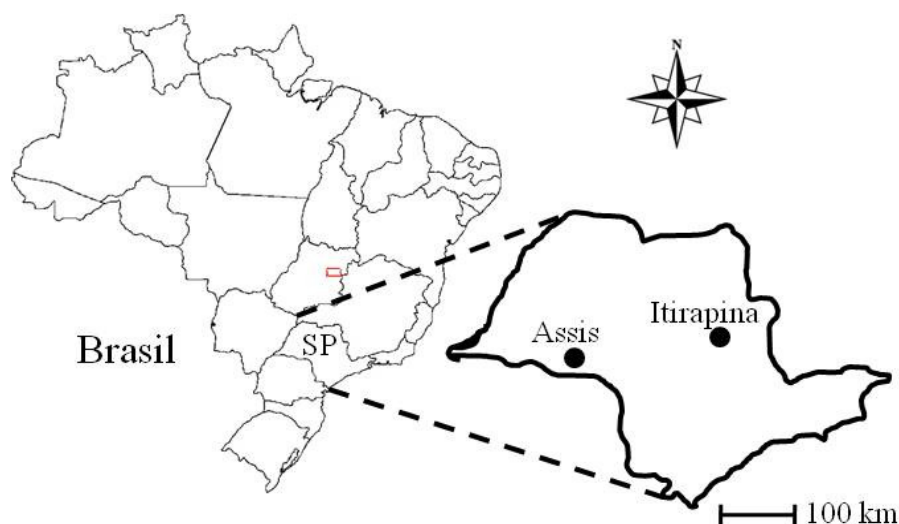


Figura 6 - Localização geográfica dos municípios de Assis-SP e Itirapina-SP

##### 3.1.1 Estação Ecológica de Itirapina

A Estação Ecológica de Itirapina (EEI) (Figura 7) está localizada nos municípios de Itirapina e Brotas (S 22°11' e 22°15' e W 47°5 1' e 47°56') pertence ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo. Criada pelo Decreto de nº 22. 335, de 7 de junho de 1984, localiza-se

aproximadamente a 226 km da capital do Estado, englobando partes do município de Itirapina e Brotas (GIANNOTTI; LEITÃO-FILHO, 1992). A área total da EEI é de 2.300 ha (Figura 8), constituída principalmente por fisionomias abertas de cerrado: campo cerrado, campo sujo e campo limpo, além de algumas manchas localizadas de cerradão e cerrado. Nas baixadas úmidas dos fundos de vale, onde o solo se encontra sob influência do lençol freático superficial, ocorrem extensas áreas cobertas por campos úmidos e, ao longo dos cursos d'água, encontram-se fragmentos de matas ciliares (TANNUS; ASSIS; MORELLATO, 2006).

A EEI representa um dos únicos remanescentes bem preservados e protegidos do Estado de São Paulo que apresenta formações campestres de Cerrado (INSTITUTO FLORESTAL, 2005). Mesmo estando sobre proteção do Instituto Florestal, houve o registro de incêndio criminoso dentro da Estação Ecológica de Itirapina e da Estação Experimental de Itirapina, onde foram queimados um total de 299,3 ha nos dias 8, 9 e 10 de julho de 2009 (Figura 9 e 10), nesse sentido, faz-se necessário mencionar que os indivíduos de *D. hispida* localizam-se na área incendiada dentro da EEI.

O entorno da EEI inclui monoculturas de *Eucalyptus spp* e *Pinus spp*, (localizados na Estação Experimental de Itirapina, contígua a esta UC), cítricos, canaviais, pastos e a represa do Lobo (ou do Broa), além de um remanescente de campo cerrado com cerca de 300 ha pertencente à USP *campus* São Carlos.

A altitude máxima encontrada é de 750 m e a mínima de 705 m. O solo é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo fase rasa (LVr) por Ventura, Berengut e Victor (1965/66). O clima é do tipo Cwa de Köppen, tropical de altitude com inverno seco e verão chuvoso, com precipitação média anual de 1.450,1 mm e temperatura média de 22°C. A estação chuvosa compreende o período de outubro a março, enquanto a estação seca inclui o período de abril a setembro (CEPAGRI/UNICAMP, 2011).

Dentro da EEI foi escolhida aleatoriamente uma área onde pudesse haver no mínimo 100 indivíduos de *D. hispida* (CAVERS et al., 2005); esses indivíduos foram marcados com plaquetas metálicas devidamente numeradas e georeferenciados com auxílio de um aparelho GPS (GARMIN 76CXS), bússola e trena. Foi utilizado o programa de georeferenciamento GPS Trackmaker (FERREIRA, 2002) para transferir os dados do aparelho GPS para o computador. Nos locais onde houve agregação de indivíduos, pontos centrais foram mapeados com GPS e, a partir deste, os azimutes de cada indivíduo foram marcados manualmente, ou

seja, com auxílio de bússola e trena. Após a marcação dos indivíduos, foram medidas as circunferências na altura da base (CAB) usando-se fita métrica.

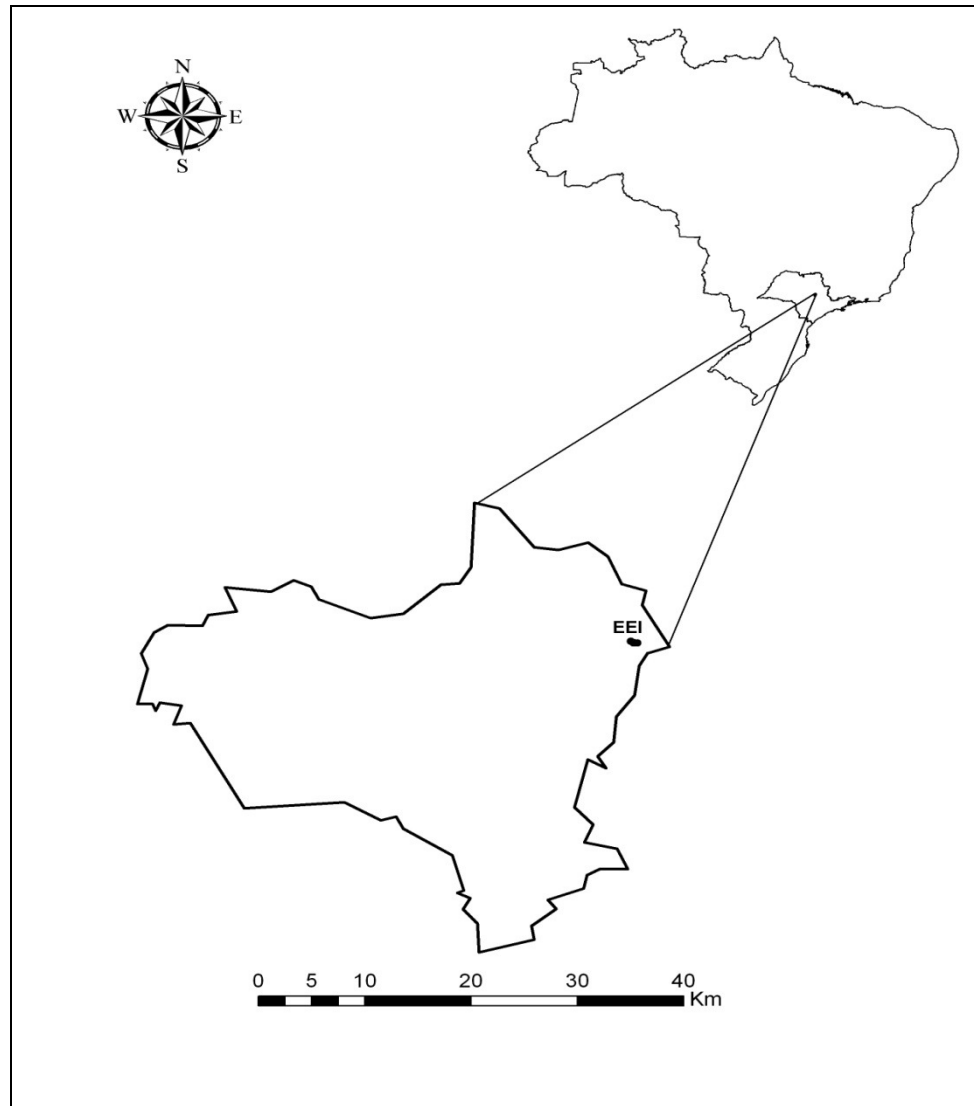


Figura 7 - Localização da EEI no município de Itirapina-SP. Programa ArcGis 9.0 – ArcMap versão 9.2

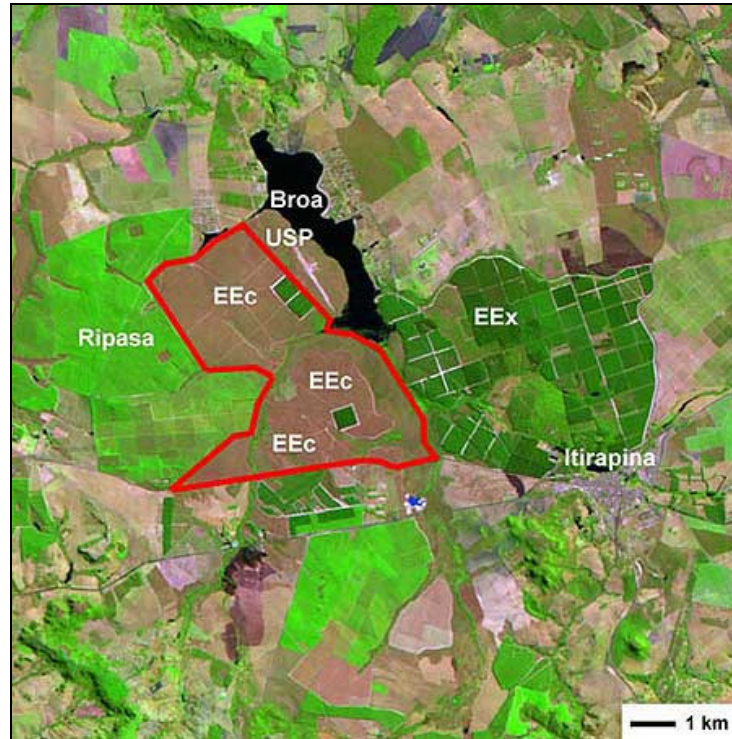


Figura 8 - Localização da Estação Ecológica de Itirapina (contorno em vermelho) no município de Itirapina-SP  
Fonte: Google Earth.

Para realização de análises genéticas com uso de marcadores microssatélites, as amostras foliares de 100 indivíduos foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos identificados com o número da árvore e acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo, de modo que possibilitasse a extração de DNA do material ainda fresco; em seguida foram encaminhadas ao Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas – LARGEA e mantidas a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

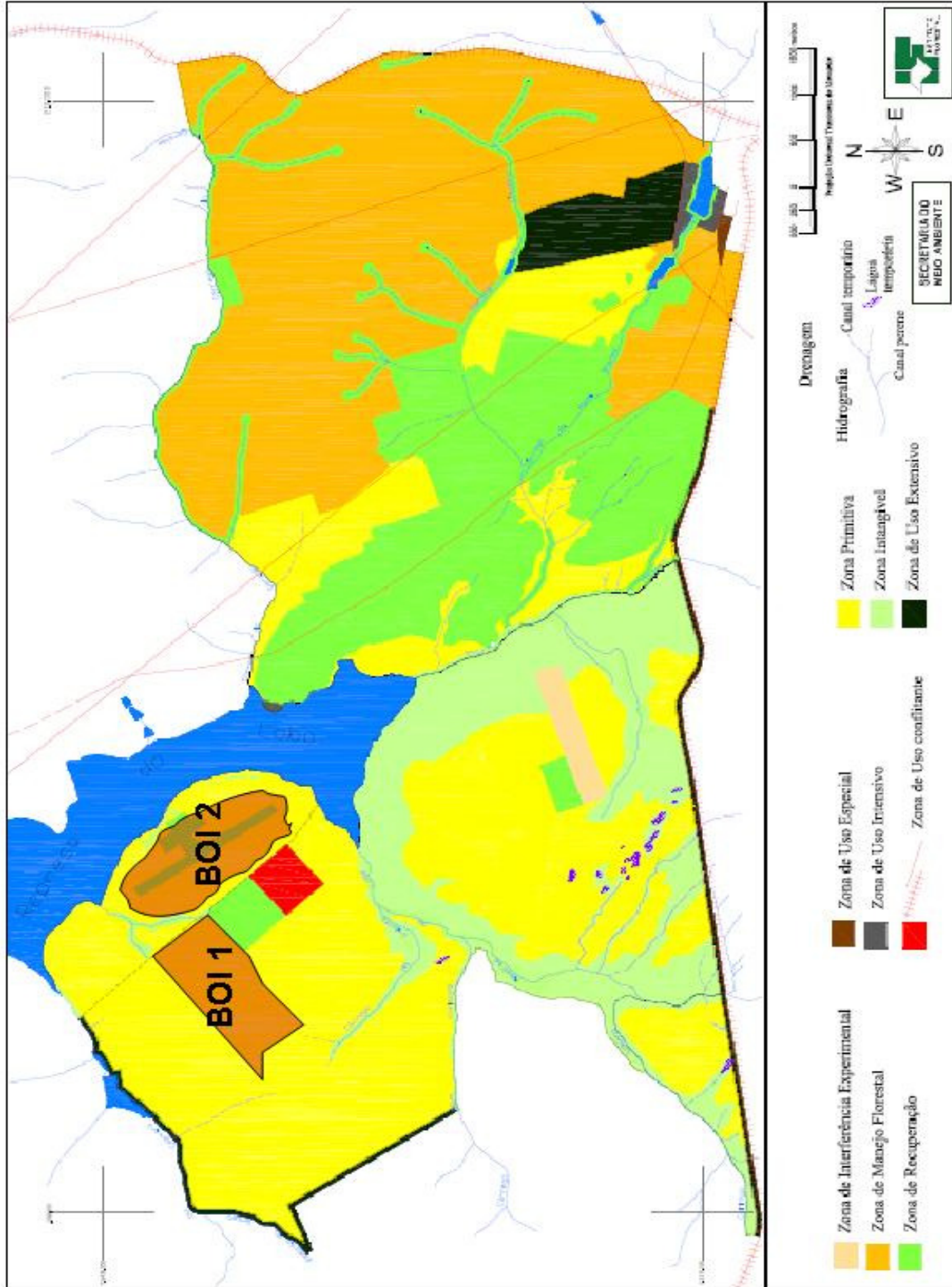


Figura 9 - Áreas Queimadas e Registradas com Boletim de Ocorrência de Incêndio (BOI).

BOI 1 – Estação Ecológica: 179,4 ha

BOI 2 – Estação Experimental (aeroporto): 120 ha





Figura 10 – Vista geral de uma das áreas incendiadas na Estação Ecológica de Itirapina  
Fonte: RUFINO, P. H.P. (2009).

### 3.1.2 Floresta Estadual de Assis

A Floresta Estadual de Assis (FEA) (22° 34' S – 50° 24' W) pertence ao Instituto Florestal (Figura 11) e foi criada pelo Decreto Estadual nº 47.098 de 18 de setembro de 2002. A FEA possui uma área total de 2.719,36 ha (Figura 12), constituída por antigos talhões de *Eucalyptus spp* e *Pinus spp*. A área apresenta também inúmeras manchas de cerrado *stricto sensu* e mata ciliar; na FEA localiza-se a principal nascente que abastece a população urbana do município de Assis (MAX et al.; 2007 e VITALLI, 2007).

A altitude máxima encontrada é de 590 m. O solo é composto de três tipos de formações: **Lea1** – Latossolo Vermelho distrófico típico álico textura média a moderado, **AQa** – Neossolo Quartzarênico órtico e **PV2** – Argissolo Vermelho amarelo eutrófico abruptico A moderado textura arenosa/média. O Latossolo ocupa 95% da área e o restante da área é composta por Argissolo. O clima é do tipo Cwa de Köopen, em que as chuvas do mês mais seco giram em torno de 30 mm, a temperatura média do mês mais quente é de 22 °C e a do mês mais frio ao redor de 18 °C. O período chuvoso da região ocorre entre os meses de outubro a março, meses em que chove mais que 100 mm. A temperatura média é de 21,8 °C, apresentando uma variação média diária de 4,5 °C (MAX et al.; 2007).

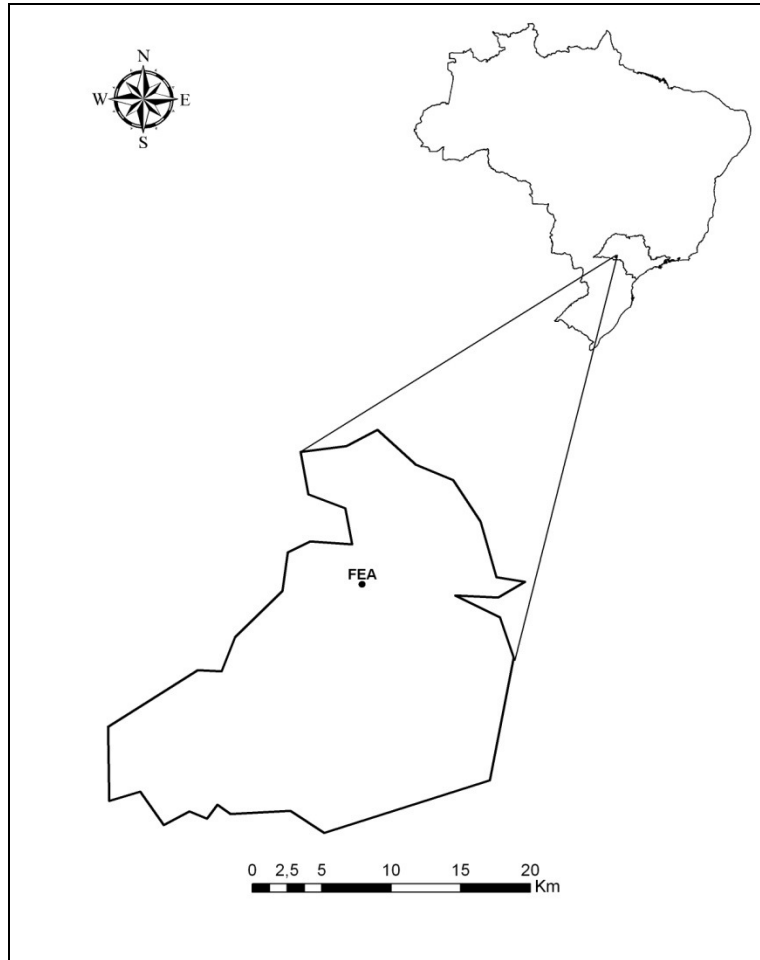


Figura 11 - Localização da FEA no município de Assis-SP. Programa ArcGis 9.0 – ArcMap versão 9.2.

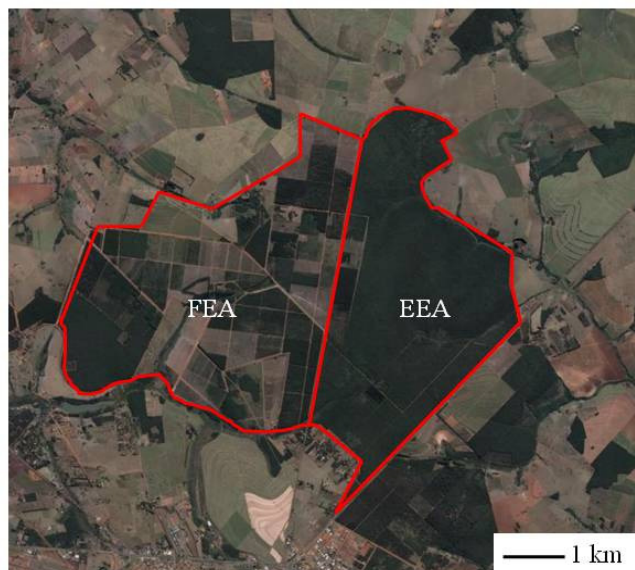


Figura 12 - Localização da Estação Ecológica de Assis e da Floresta Estadual de Assis (contorno em vermelho) no município de Assis-SP

Fonte: Google Earth.

Os procedimentos utilizados para a localização da área, identificação e coleta dos indivíduos para as análises genéticas foram exatamente idênticos aos utilizados para a EEI.

## 3.2 Procedimentos laboratoriais

### 3.2.1 Extração e quantificação do DNA

Para a realização das análises genéticas, foram testados três diferentes protocolos: Doyle e Doyle (1990), Tai e Tanksley (1991) e Faleiro et al.(2002) em onze indivíduos de *D. hispida*. Optou-se trabalhar com o protocolo de Doyle e Doyle (1990) por ter apresentado melhores resultados; no entanto, o protocolo sofreu adaptações.

A extração do DNA genômico total das amostras foi realizada a partir de cerca de 150 mg de tecido vegetal fresco (FERES et. al., 2005) macerado com nitrogênio líquido. O método utilizado foi o CTAB descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), no entanto faz-se importante destacar que o mesmo sofreu algumas modificações que aumentaram o êxito da extração de DNA, sendo elas: aumento no volume do tampão de extração, aumento no volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e um aumento no volume de isopropanol.

Nesse sentido, o protocolo possuiu as seguintes etapas: (1) Em tubos do tipo *ependorffs* de 2,0 mL devidamente identificados para cada amostra, foram adicionados 900 µL de tampão de extração (pré-aquecido a 65°C) nos cerca de 150 mg do tecido macerado, então agitados para ressuspender o tecido no tampão; (2) foram levados ao banho-maria (65°C) por 60 minutos, agitando-os manualmente a cada 10 minutos; (3) após serem retirados do banho-maria e resfriados até temperatura ambiente, foram adicionados aos tubos 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitados invertendo-os por pelo menos 50 vezes até fazer uma emulsão homogênea; (4) os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm; (5) o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo tubo também identificado; (6) foram adicionados 700 µL de isopropanol frio (mantido a -20°C) e homogeneizado suavemente até formar um precipitado; (7) os tubos foram armazenados em freezer (-20°C) por 24 horas; (8) posteriormente foram centrifugados durante 10 minutos a 14000 rpm para formação dos *pellets*; (9) foi descartado o máximo de sobrenadante invertendo os tubos sem perder os *pellets*; (10) estes foram lavados em 500 µL de etanol 70% por duas vezes e com 500 µL de etanol 95% por uma vez; (11) foi retirado o máximo de etanol dos tubos sem perder os *pellets*; (12) os tubos permaneceram à temperatura ambiente sobre bancada *overnight* para a secagem dos *pellets*; (13) cada *pellet* foi diluído em cerca de

30  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de RNase (15mg/mL) e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Após a extração, realizou-se a quantificação do DNA presente nas amostras por meio da análise comparativa de cada amostra com amostras de DNA de concentração conhecida (DNA  $\lambda$ ), submetidos à eletroforese (80V e 41mA) durante 30 minutos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Posteriormente foram diluídos em água MilliQ a concentração de 5ng/ $\mu\text{L}$ .

### 3.2.2 Construção de biblioteca genômica enriquecidas com microssatélites

Para a caracterização da variabilidade genética na espécie foi construída uma biblioteca genômica para a seleção dos fragmentos contendo os microssatélites. O protocolo utilizado foi descrito por Billotte et al. (1999), com modificações e otimizado por Angie-Marie Risterruci do CIRAD/França. A construção da biblioteca foi realizada no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento, localizado no Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Foi escolhido o indivíduo número 91 com as coordenadas X = 560140 e Y = 7501581, coletado em Itirapina para ser modelo da espécie, cujo DNA extraído apresentou 300ng/ $\mu\text{L}$ . Um total de 5 $\mu\text{g}$  de DNA foi digerido por uma reação contendo 5 $\mu\text{L}$  enzima *Rsa I* na concentração de 10 u/ $\mu\text{L}$ , 10 $\mu\text{L}$  tampão (fornecido pelo fabricante da enzima) e 50 $\mu\text{L}$  água MilliQ autoclavada; esse coquetel foi mantido em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. A digestão foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% durante 1,5 h a 60 V.

Para garantir que todos os fragmentos digeridos tivessem uma terminação comum e conhecida o produto da digestão foi ligado aos adaptadores *Rsa 21* (5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') e *Rsa 25* (5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'). A reação foi realizada com 3 $\mu\text{L}$  de DNA digerido, 1,5 $\mu\text{L}$  de *Rsa 21*, 1,5 $\mu\text{L}$  de *Rsa 25*, 2 $\mu\text{L}$  da enzima T4 DNA ligase (1u/ $\mu\text{L}$ ), 5 $\mu\text{L}$  de tampão (fornecido pelo fabricante da enzima) e 12 $\mu\text{L}$  água MilliQ autoclavada e incubada por 2 h a  $20^{\circ}\text{C}$  em termociclador.

Após a ligação aos adaptadores, realizou-se a pré-amplificação via PCR para aumentar a quantidade de fragmentos ligados. A reação foi feita utilizando 3 $\mu\text{L}$  de fragmentos ligados aos adaptadores e 47 $\mu\text{L}$  de um coquetel contendo 4 $\mu\text{L}$  de dNTPs (0,2mM), 2 $\mu\text{L}$  de *Rsa 21*

(10 $\mu$ M), 5 $\mu$ L de Taq DNA polimerase, 5 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 5 $\mu$ L de tampão 10X e 27,5 $\mu$ L de água Miliq autoclavada.

As reações de PCR foram feitas em termociclador, no qual as amostras foram submetidas inicialmente a 95°C por 4 minutos, 20 ciclos a 90°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e finalizando a 72°C por 2 minutos. Após os 20 ciclos, as amostras foram mantidas durante 8 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X, contendo *Syber Safe* utilizando corrente elétrica de 110V durante 1,5 hora. Um *ladder* de 100pb foi utilizado como marcador de peso molecular. Decorrido o tempo da eletroforese, o gel foi retirado da cuba e levado para a fotodocumentação. Revelando as bandas de DNA marcadas com *Syber Safe*, sobre fonte de luz ultravioleta.

O produto da PCR foi purificado através de um *kit* de purificação, conforme instruções do fabricante. A purificação foi verificada em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X contendo *Syber Safe*, utilizando uma corrente elétrica de 110 V durante 1 hora.

Em seguida foi realizada a seleção dos fragmentos contendo microssatélites, através das *beads* magnéticas e das sondas biotiniladas contendo repetições em *tandem* de dinucleotídeos CT (5' BiotOOOOOTCTCTCTCTCTCTCTCT 3' – Nome: *BiotCT*) e GT (5' BiotOOOOOGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 3' – Nome: *BiotGT*).

A solução de 600 $\mu$ L de *beads* foi lavada com 300 $\mu$ L de SSC 0,5X (obtido através da diluição em água Miliq autoclavada do SSC 20X que é composto por Cloreto de Sódio 3M, Citrato de Sódio 0,3M e água Miliq autoclavada com pH igual a 7,0). Esse procedimento foi repetido por mais três vezes.

Paralelamente o DNA foi preparado através da diluição de 40 $\mu$ L de DNA em 460 $\mu$ L de água Miliq autoclavada e posterior incubação em banho-maria a 95°C durante 15 minutos. Após incubação a amostra recebeu 13 $\mu$ L de SSC 20X, 3 $\mu$ L de cada oligonucleotídeo (CT e GT) e foi deixada a temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo agitada lentamente a cada 2 minutos.

Posteriormente adicionou a mistura de DNA e oligonucleotídeo ao tubo das *beads*, incubado durante 10 minutos em temperatura ambiente, agitando continuamente de forma lenta. O tubo foi colocado numa *rack* magnética e o sobrenadante foi descartado. As *beads* foram ressuspensas em SSC 0,1X e lavadas mais quatro vezes. Finalmente foram ressuspensas em 250 $\mu$ L de água Miliq autoclavada e o sobrenadante, após magnetização, foi transferido para um novo tubo tipo *ependorff* com capacidade de 1,5 mL.

Os fragmentos selecionados foram amplificados via PCR, utilizando 20µL dos mesmos, aos quais adicionaram-se 80µL de um coquetel contendo 51,5µL de água Miliq autoclavada, 10µL de tampão de PCR 10X, 6µL de MgCL<sub>2</sub> (25mM), 8µL de dNTPs (2,5mM), 4µL de *Rsa* 21 (10µM) e 0,5µL de Taq DNA polimerase.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador, no qual a amostra foi submetida inicialmente a 95°C por 1 minuto, 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos em todos os 25 ciclos de amplificação. Terminada a amplificação, as amostras foram mantidas durante 5 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1X, contendo *Syber Safe*, com corrente elétrica de 70V durante 1,5 hora. Um *ladder* de 100pb foi utilizado como marcador de peso molecular. Concluída a eletroforese o gel foi fotografado sob luz ultravioleta, revelando as bandas de DNA marcadas com *Syber Safe*.

Os fragmentos amplificados foram ligados a um vetor de clonagem *pGEM-T-Vector*. A ligação foi feita através da reação contendo 10µL de tampão, 1µL de plasmídeo, 1µL de enzima ligase e 8µL dos fragmentos a 4°C durante 15 horas.

Foram utilizadas as células competentes da cepa DH5α de *Escherichia coli*, preparadas através do protocolo de Cloreto de Rubídeo. Cem microlitros de células competentes foram adicionadas a 4µL de fragmentos ligados ao vetor e deixadas sobre gelo durante 20 minutos, assim as células sofreram choque térmico, sendo mergulhadas em banho-maria a 42°C por 2 minutos, sendo novamente colocadas sobre gelo durante 5 minutos. Em seguida, na câmara-fluxo, adicionaram-se 450µL de meio LB líquido (0,1% de triptona, 0,05% de extrato de levedura, 0,1% de NaCl em água Miliq autoclavada, com pH igual a 7,0) autoclavado e pré-aquecido a 37°C durante 50 minutos.

Concluída a incubação, o tubo contendo as células foi centrifugado durante 30 segundos a 13000 rpm e 530µL do sobrenadante foi descartado. O volume restante de 90µL, incluindo o *pellet*, foram aliquotados em três placas de Petri, cuja quantidade foi de 20µL, 30µL e 40µL respectivamente. As placas de Petri continham meio LB sólido (0,1% de triptona, 0,05% de extrato de levedura, 0,1% de NaCl e 0,15 % de *Select Agar* em água Miliq autoclavada, com pH igual a 7,0) com 100µg/mL de ampicilina. Também aliquotou-se na placa de Petri 60µL de IPTG a 20% e 60µL de X-GAL a 2%. As placas foram incubadas em *shaker* a 37°C durante 15 horas.

Decorrido o período de incubação, as colônias que apresentaram coloração branca foram repicadas em placa *Elisa* que continham 180µL de meio 2YT-HMFM (8g de triptona, 5g de extrato de levedura, 2,5g de NaCl, 0,038g de MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 0,225g de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (2H<sub>2</sub>O), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 22g de glicerol, 0,9g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,35g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e água Miliq autoclavada) e 100µL de ampicilina. Por fim, as placas foram incubadas em *shaker* a 37°C *overnight* e transferidas para freezer com temperatura de -20°C.

Para verificar se os clones transformados apresentavam os insertos, foi realizada uma PCR com 2µL do conteúdo de cada poço da placa *Elisa*, 2,5µL de tampão 10X, 2,0µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2,0µL de dNTP (2,5mM), 1,25µL de *Afa 2I* (10µM), 2,0µL de Taq DNA polimerase, 2,0µL de DNA clone e 13,25µL de água Miliq autoclavada. As reações de PCR foram feitas em termociclador iniciando em 95°C por 4 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e 75°C por 1 minuto e 30 segundos finalizando em 72°C por 8 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X sob corrente elétrica de 110 V durante 1 hora. O gel foi fotografado com luz ultravioleta revelando as bandas de DNA previamente coradas com brometo de etídeo; dessa forma foi possível identificar quais clones possuíam o inserto. A presença de duas bandas no mesmo poço do gel indica que existem dois clones com insertos diferentes no mesmo poço da placa; nesse caso deve-se descartar as amostras desse poço.

Os clones transformados foram mantidos em freezer -80°C até a etapa seguinte, onde os plasmídeos foram extraídos das células. Nessa etapa utilizou-se placas de 96 poços fundos, aos quais adicionou 1mL de meio *LB líquido* contendo 100µL de ampicilina e 4µL do conteúdo de cada poço da placa *Elisa*. As placas foram fechadas com adesivo que foi furado com agulha para permitir aeração durante o crescimento. Em seguida, as placas foram incubadas em *shaker* a 37°C, com 300 rpm, durante 22 horas.

Após o período de incubação, o adesivo das placas foi substituído por um novo e então foram centrifugadas a 3000 rpm durante 6 minutos, para que as células sedimentassem no fundo de cada poço; o sobrenadante foi descartado por meio da inversão da placa sobre papel absorvente durante 1 minuto. A cada poço da placa foi adicionado 240µL de GTE, em seguida as placas foram seladas e as células ressuspensas no vortex durante 2 minutos, depois desse processo as placas foram centrifugadas durante 6 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante novamente descartado por inversão da placa. As células novamente foram ressuspensas com 80µL de GTE e agitadas no vortex durante 5 minutos; em seguida foi transferido 60µL

desse conteúdo para uma placa *Elisa*, na qual previamente já havia sido pipetado 5µL de RNase (10mg/mL).

Em seguida, a cada poço da placa foram adicionados 60µL de NaOH 0,2M-SDS1% e então misturou-se todo o material, em seguida sob temperatura ambiente a placa foi incubada durante 10 minutos. Decorrido o tempo, as placas foram colocadas na centrífuga na opção “spin” (até 1000 rpm) para limpar o adesivo selador, pois com a inversão das placas boa parte da solução ficou aderida ao mesmo. Na seqüência cada poço da placa recebeu 60µL de KOAc 3M (estocado a 4°C) e novamente misturou-se 10 vezes por inversão; em seguida foi novamente colocada na centrífuga na opção “spin” (até 1000 rpm).

Depois do pulso sofrido pela centrífuga o adesivo foi retirado da placa e a mesma incubada em estufa a 90°C durante exatos 30 minutos e, então, a placa foi resfriada em gelo por 10 minutos e novamente centrifugadas por 4 minutos a 4000 rpm a 4°C. Na seqüência uma placa-filtro foi fixada numa placa *Elisa*, de modo que os poços de ambas ficassem alinhados e o conteúdo da placa anterior foi transferido para a placa-filtro, deixando um precipitado branco na placa que foi então descartada.

O conjunto placa-filtro mais placa *Elisa* foi centrifugado por 4 minutos a 4000 rpm a 20°C; nessa etapa a placa-filtro foi removida e descartada. A cada poço da placa *Elisa* contendo o filtrado foi adicionado 90µL de isopropanol. A placa foi selada e invertida 20 vezes, sendo então centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos a 20°C.

O sobrenadante foi descartado por inversão e 160µL de etanol 70% (gelado) foi adicionado em cada poço da placa que foi centrifugada durante 10 minutos a 4000 rpm a 4°C sendo o sobrenadante mais uma vez descartado. A placa foi colocada invertida sobre papel absorvente e nessa posição foram colocadas na centrífuga, onde a placa sofreu um “spin” de 300 rpm. Após o pulso emitido pela centrífuga, a placa foi colocada sobre a bancada para secagem em temperatura ambiente. Após a completa secagem, adicionou-se 30µL de água Miliq autoclavada em cada poço da placa e essa foi mantida (*overnight*) sobre a bancada, na ausência de luz.

A qualidade e a concentração do DNA de algumas amostras aleatórias dos plasmídeos foram verificadas em gel de agarose a 1%. Utilizou-se 3µL de plasmídeos em comparação com um plasmídeo comercial (*P-GEM 3Z*, parte integrante do kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*). A placa contendo os plasmídeos extraídos foi congelada a -20°C.

Após conferir a qualidade e a concentração do DNA, as amostras foram purificadas de modo a eliminar possíveis interferentes ou excessos de reagentes da reação de



seqüenciamento e deixar as amostras prontas para eletroforese. Nesse sentido, foram adicionados 80µL de isopropanol a 65% (*Big Dye vs.3*) em cada poço da placa e essa foi centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm a 10°C; em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente descartado sobre papel absorvente e então a placa ainda invertida sobre o papel absorvente sofreu um “spin” de até 200 rpm na centrifuga e durante uma hora a placa ficou em processo de secagem (temperatura ambiente) num local arejado e sem luminosidade; na seqüência o DNA foi ressuspensionado em 4µL de tampão de corrida (*Blue Dextran + formamida*) e desnaturado durante 3 minutos a 95°C.

### 3.2.3 Seqüenciamento da região de interesse dos plasmídeos

Essa etapa tem como finalidade amplificar o inserto em condições nas quais o fragmento possa ser seqüenciado automaticamente. Nesse sentido a reação de seqüenciamento foi preparada utilizando 1µL de água Miliq autoclavada, 2µL de tampão Save Money, 1µL de *primer* (0,5µM), 4µL de plasmídeo, 0,4µL de *Big Dye* (vs.3.1).

A reação de seqüenciamento foi realizada em termociclador, no qual as amostras foram submetidas inicialmente a 96°C por 2 minutos, 35 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos em seguida a reação foi congelada a -20°C.

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador 3730 *DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*) e as seqüências obtidas foram processadas pelo software 3730/3730xl *Data Collection Software v 3.0* (*Applied Biosystems*).

### 3.2.4 Desenho dos oligonucleotídeos de DNA

As seqüências obtidas foram transformadas em formato “FASTA” pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* e os trechos referentes ao vetor e ao adaptador foram excluídos.

O programa *Webtroll* (disponível em: <http://wsmartins.net/webtroll/troll.html>) possibilitou a identificação dos microssatélites nas seqüências obtidas. Os parâmetros utilizados para a localização de microssatélites foram os seguintes: microssatélites compostos por motivos dinucleotídeos devem ter no mínimo sete repetições do motivo, microssatélites compostos por motivos trinucleotídeos devem ter no mínimo cinco repetições do motivo e microssatélites compostos por motivos tetranucleotídeos devem ter no mínimo três repetições do motivo.

O programa *Primer3* (disponível em: [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) foi utilizado para o desenho dos *primers*. Os parâmetros foram configurados para a obtenção de *primers* que possuíam produto final da amplificação localizado no intervalo de 100 pb a 300 pb, o tamanho dos *primer* deve estar entre 18pb e 22 pb e a porcentagem de GC deve estar no intervalo de 40% a 60%.

O software *Gene Runner* v. 3.1, além de confirmar os valores para cada um dos parâmetros acima citados, também acusa a formação de estruturas secundárias, que são indesejáveis se ocorrerem em temperaturas próximas das temperaturas da reação de PCR. Desta forma, foi possível avaliar a qualidade de cada par de *primers* obtido, selecionando os mais adequados para as reações de PCR.

O software *Chromas 2.33* foi utilizado para avaliar a qualidade do seqüenciamento nas regiões dos *primers* e dos microssatélites.

### 3.2.5 Caracterização e genotipagem dos microssatélites

Os locos selecionados foram utilizados para a genotipagem e caracterização dos indivíduos de duas populações de *D. hispidus*.

A maioria dos *primers* utilizados no estudo é constituído de repetições de dinucleotídeos, como pode ser observado na Tabela 1, que quando detectados em géis de poli-acrilamida de alta resolução podem apresentar bandas “*stutter*” que dificultam a genotipagem, especialmente em indivíduos heterozigotos para alelos que diferem em poucos pares de bases.

As reações de PCR continham: 15 ng de DNA nuclear, 1,34 µL de água MilliQ autoclavada, 1,30 µL de tampão 10X, 1,30 µL de dNTP (25mM), 1,30 µL de BSA (2,5mg/mL), 0,26 µL de cloreto de magnésio (25mM), 4,30 µL de primer (10 µM) e 0,20 µL de taq DNA polimerase, totalizando um volume final de 10µL.

De modo geral, as PCR's foram realizadas seguindo o padrão: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, a temperatura de anelamento por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e 15 segundos, finalizando em 72°C por 5 minutos.

Para o *primer* DH E3, foi realizado o programa de PCR Touchdown, pois ainda havia muitas bandas inespecíficas, deixando duvidosa a leitura do gel. O programa Touchdown foi composto por 19 ciclos na temperatura de anelamento, que decresciam 0,5°C por ciclo, sendo assim, o programa foi realizado da seguinte forma: 94°C por 1 minuto, 92°C por 2 minutos,

70°C (-0,5°/ciclo), 19 vezes o ciclo número 2, 92°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos mais 1 segundo por ciclo, finalizando com a repetição do ciclo número 5 por 19 vezes.

A eletroforese foi realizada em cubas verticais com TBE 1X e placas de vidro contendo gel de poliacrilamida a 5%. Antes da aplicação das amostras o gel foi submetido à pré-corrída durante 40 minutos. Os géis obtidos foram corados em solução de 0,2% de nitrato de prata (CRESTE et al., 2001). A genotipagem dos indivíduos deu-se por comparações da amplitude da banda de DNA com o *ladder* 10pb, cada banca com amplitude diferente foi considerada um alelo diferente.

Tabela 1 - Marcadores moleculares microssatélites de *D. hispida*

Loco	Motivo	Seqüência do <i>primer</i> (5'-3')	Amplitude (pb)
DH 1*	(AC)7	F: CGCGTGGACTAACTCAGGA R: GATGAAAAGGAGCCTGGAGA	190
DH1-1*	(CA)6	F: ACGCAGCAAAAATACTCAACC R: ATTTGAGACCCGATCTGTGG	228
DH 2	(AT)5	F: TTAGTCCAACCAAGCCAACC R: TCGCCGAAAAGAAAGATGAT	126
DH 2B*	(TG)8(TA)2CA(TA)3	F: CCCACCAAACAGCATAAAGAA R: ATAGATAACCGACCGCCAAC	177
DH 4	(AC)20	F: GCTTGTAGCCAATGCTTCCT R: CACGACGCAATGTTCAAAGT	258
DH 5	(GT)20	F: GCGTGGACTAACTTCGTTGAG R: GCACATACATCCTGCCAATG	135
DH 9*	(TA)5GA(TA)4(TG)12	F: TCTTGGTTGCATTGGGTGTA R: GGTTGAGACAACATGACTGG	168
DH D2	(CA)8	F: GCGTTCACGGCTTAGAAAAC R: CATGAGGACTCCAACACCATT	274
DH D3*	(TA)4	F: CCCTAAAACATAAACCGCTTC R: CGTGTTGATGCAGGTAAACA	192
DH E3*	(GT)19	F: TCGATTCTCTTGCTTACGC R: CATGTAAGGCCACAGGAA	102
DH F1	(TA)2(TG)18	F: CCTACGTGCATACACGAT R: TCTTTGCAACCTTAGCTCCA	118
DH F2*	(GC)2(GT)9(CG)8	F: CTCTCTGTGCTTGGTCGTCT R: ATCTCCACTCCCCGACT	279
DH F3	(GA)21	F: GCCATAAGCGAGGAAGAAAG R: TTGATGACCACCAACTCC	170

Somente os *primers* marcados com \* foram utilizados nesse estudo.

## 4 ANÁLISE DE DADOS

### 4.1 Estrutura demográfica

Foi calculada a média da circunferência à altura da base (CAB). A distribuição espacial dos indivíduos de *D. hispida* foi calculada através do programa computacional SGS (Spatial Genetic Software) (DEGEN et al., 2001) por meio da significância do índice Clark e Evans (R), o qual calcula a distância média do vizinho mais próximo (DMVP) (CLARK; EVANS, 1954): form. (1)

$$R = \frac{R_o}{R_E} \quad (1)$$

Onde:

$R_o$  = distância média observada do vizinho mais próximo: form. (2)

$$R_o = \frac{\sum r_i}{n} \quad (2)$$

$r_i$  = distância do vizinho mais próximo

$n$  = número de observações;

$R_E$  = distância esperada do vizinho mais próximo: form. (3)

$$R_E = \frac{1}{2\sqrt{d}} \quad (3)$$

$d$  = densidade média de indivíduos/m<sup>2</sup>;

Para a significância estatística foi utilizado o teste Z: form. (4)

$$Z = \frac{|R_o - R_E|}{s} \quad (4)$$

$s$  = desvio padrão

Se  $R = 1$  distribuição aleatória,  $R < 1$  distribuição agregada (0 = mínimo) e  $R > 1$  distribuição uniforme (2.149 = máximo).

## 4.2 Diversidade genética

As estimativas das frequências alélicas juntamente com o número de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e os índices de fixação intrapopulacional ( $\hat{f}_i$ ), foram estimadas pelo programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). As heterozigosidades observadas ( $\hat{H}_o$ ) e esperadas ( $\hat{H}_e$ ), o poder de não exclusão dos parentais (P(Ex12)), assim como o poder de não exclusão para a identidade clonal (P(ExI)), foram realizadas empregando-se o programa CERVUS 3.0 (Kalinowski; Taper; Marshall, 2007) e posterior correção sequencial de Bonferroni. O teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo teste Exato de Fisher através do programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

## 4.3 Diferenciação de clones e diversidade clonal

Antes de estimar os vários parâmetros de caracterização da diversidade genética foi necessário diferenciar os possíveis clones nas populações da EEI e da FEA devido à presença de reboleiras em ambas as populações. Desta forma, para que as estimativas não fossem comprometidas devido a réplicas nos genótipos, todas as análises de diversidade genética apresentadas neste trabalho foram realizadas com a presença de clones e com a posterior retirada dos mesmos, com a finalidade de conhecer a influência da propagação clonal nas estimativas de diversidade genética e estrutura genética espacial. Foi utilizado o programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007) para os cálculos relacionados à análise da diversidade clonal.

A diversidade clonal foi calculada de acordo com Dorken e Eckert (2001): form. (5)

$$DC = \frac{G-1}{N-1}. \quad (5)$$

Em que  $G$  representa o número de genetes encontrados na amostra e  $N$  o número total de indivíduos amostrados.

A heterogeneidade clonal, ou seja, a probabilidade de duas unidades amostrais escolhidas ao acaso do total amostral pertencer à mesma linhagem clonal foi calculada a partir do Índice de Simpson (SIMPSON, 1949) adaptado para diversidade genotípica ( $D^*$ ) (PIELOU, 1969), onde sua estimativa não viesada para um tamanho amostral  $N$  foi calculado como: form. (6 e 7)

$$D^* = 1 - L, \quad (6)$$

em que

$$L = \sum_{i=1}^{Gl} \left[ \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \right]. \quad (7)$$

Desta forma,  $Gl$  é o número de linhagens multilocos detectados em uma amostra,  $n_i$  é o número de amostras dentro das linhagens multilocos e  $N$  o número total de rametes.

#### 4.4 Estrutura genética espacial

Para a análise da estrutura genética espacial, foi utilizado o programa SPAGEDI (HARDY e VEKEMANS, 2002). A caracterização da distribuição espacial dos genótipos dentro das populações será realizada a partir das estimativas dos coeficientes de coancestria entre pares de plantas, dentro de diferentes classes de distância. O coeficiente de coancestria será calculado com base no método de Loiselle et al. (1995), conforme descrito por Bittencourt e Sebbenn (2007): form. (8).

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk})(p_{yjk} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k (1 - \bar{p}_{lk})\bar{p}_{lk}} + \left[ \sum_l \frac{1}{(2n_l - 1)} \right] \quad (8)$$

Em que  $\theta_{xy}$  = coeficiente de coancestria,  $p_{xlk}$  e  $p_{yjk}$  = freqüências do alelo  $k$  no loco  $l$  nos indivíduos  $x$  e  $y$  (assumindo valores de 0, 0,5 e 1 em indivíduos homozigotos para o alelo alternativo, heterozigotos e homozigotos para o alelo sob consideração, respectivamente) e  $\bar{p}_{lk}$  = média da freqüência do alelo  $k$  no loco  $l$  na subpopulação com  $n_l$  (número de genes) no loco  $l$ .

Para obter o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foram realizadas 10.000 permutações de genótipos entre classes de distância.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Aspectos demográficos

Os resultados comparativos dos aspectos demográficos entre as populações da EEI e da FEA encontram-se na Tabela 2. Na EEI a maioria dos indivíduos da população estavam agrupados (Figura 13), formando agrupamentos de 2 a 34 plantas (Tabela 3). Somente um indivíduo ocorre de forma isolada. O índice de dispersão de Clark-Evans revelou que a distância média do vizinho mais próximo ( $R_o$ ) entre indivíduos foi de 39 m, variando de 0,01 a 1853 m e o índice de dispersão ( $R_{\text{indivíduos}}$ ) para os indivíduos foi significativo ( $R = 0,574$ ;  $p < 0,01$ ), indicando um alto grau de agregação. Os indivíduos apresentaram uma circunferência média à altura da base (CAB) de 4,82 cm e altura média de 0,34 m (Tabela 2).

Assim como na EEI os indivíduos da FEA também estavam agrupados (Figura 14) formando agrupamentos de 2 a 16 plantas (Tabela 4). O índice de dispersão de Clark-Evans revelou que a distância média do vizinho mais próximo ( $R_o$ ) entre indivíduos foi de 4,65 m, variando de 0,05 a 408,85 m e o índice de dispersão ( $R_{\text{indivíduos}}$ ) para os indivíduos foi significativo ( $R = 0,718$ ;  $p < 0,01$ ), indicando um alto grau de agregação. Os indivíduos apresentaram uma circunferência média à altura da base (CAB) de 22,98 cm e altura média de 4,42 m (Tabela 2).

Tabela 2 - Aspectos demográficos de *D. hispida* nas populações da EEI e da FEA.

População	N	$R_{\text{indivíduos}}$	Altura média (m)	CAB médio (cm)
			(DP; Min. – Max.)	(DP; Min. - Max.)
EEI	100	0,574	0,34 (0,28; 0,10 – 1,60)	4,82 (3,73; 2,00 – 28,00)
FEA	100	0,718	4,42 (1,81; 1,00 – 8,00)	22,98 (8,17; 6,50 - 41,66)

N: número de indivíduos localizados na população;  $R_{\text{indivíduos}}$ : índice de dispersão de Clark e Evans para os indivíduos; Altura média (m); CAB média (cm): média da circunferência a altura da base em centímetros; DP: desvio padrão.



Tabela 3 - Número de indivíduos de *D. hispida* encontrados em cada localidade (ponto) de coleta na EEI

Pontos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº de indivíduos	1	34	25	31	9	6	6	4	5	2

Tabela 4 - Número de indivíduos de *D. hispida* encontrados em cada localidade (ponto) de coleta na FEA

Pontos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nº de indivíduos	2	3	12	7	15	15	12	7	8	16	4	12	4	3



Figura 13 – Vista geral da localização dos pontos de coleta de *D. hispida* na população da EEI  
 Fonte: Google Earth.



Figura 14 – Vista geral da localização dos pontos de coleta de *D. hispida* na população da FEA  
Fonte: Google Earth.

## 5.2 Avaliação da eficiência da extração de DNA

O melhor método de extração foi o de Doyle & Doyle (1990) (Figura 16) com modificações, apresentando 200 ng de DNA, cerca de quatro vezes mais material do que os de Tai e Tanksley (1991) e Faleiro et. al (2002), além de estarem livres de rastro de oxidação e RNase.

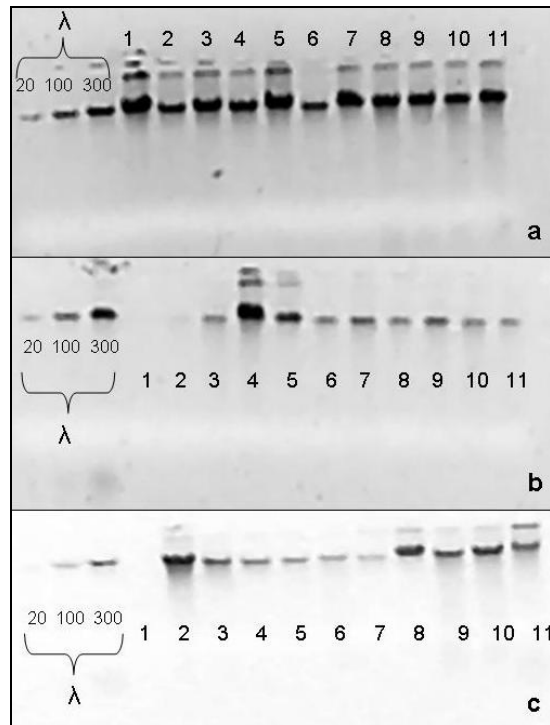


Figura 15 – Quantificação dos indivíduos de *D. hispida*: a) Doyle e Doyle (1990), b) Faleiro et al. (2002) e c) Tai e Tanksley (1991)

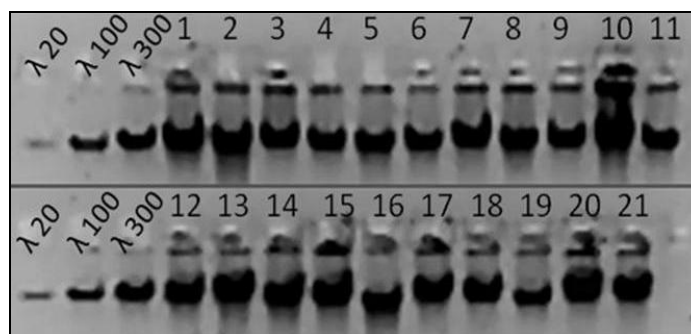


Figura 16- Perfis de DNA de indivíduos de *D. hispida* para quantificação. Géis de agarose corados com brometo de etídeo. As três primeiras colunas apresentam concentrações ascendentes de  $\lambda$  DNA: 20, 100, e 300 ng/ $\mu$ L, respectivamente

### 5.3 Transferabilidade e amplificação dos locos microssatélites nucleares

Foram testados 12 iniciadores de *Diospyros kaki* (SORIANO et al., 2006) (Tabela 5) em 14 diferentes temperaturas de anelamento ( $T_a$ ): de 46°C a 62°C, cada uma visando eliminar a amplificação de regiões inespecíficas. Os testes foram realizados com nove indivíduos de *D. hispida* e um indivíduo de *D. kaki*, sendo esse utilizado como controle da transferência.

Nenhum dos locos apresentou clara amplificação dos microssatélites (Figura 17), pois em todas as temperaturas testadas os *primers* apresentaram muitas amplificações

inespecíficas, nesse sentido, os locos não foram passíveis de interpretação. Para os pares de iniciadores DK13 e DK 16 a amplificação ocorreu somente para o *D. kaki*.

Um resultado muito semelhante a esse foi encontrado por Martins (2005), que testou a transferência de 206 *primers* de *Capsicum spp.* para *Solanum lycocarpum* e obteve somente 17 *primers* transferidos, ou seja, somente 8,29% de transferência. Sardagna et al. (2001) também testaram a transferência de 141 *primers* de *Capsicum spp.* (dentre os 206 *primers* testados por Martins, 2005) em duas espécies também pertencentes a família Solanaceae e obtiveram somente 17% de êxito na transferência; desse modo os autores concluíram que as regiões flanqueadoras dos locos microssatélites não são conservadas nessa família.

Essa não conservação das regiões flanqueadoras dos locos microssatélites também pode ocorrer para *D. hispida*, no entanto, mais *primers* necessitam ser testados para confirmar essa possibilidade.

Tabela 5 - Locos de microssatélites nucleares com os motivos, as seqüências dos iniciadores, as amplitudes alélicas em pares de base, as temperaturas de anelamento em graus Celsius ( $T_a$ ) e os números de acesso no Genebank

Locos	Motivo	Seqüência dos iniciadores (5'-3')	$T_a$ (°C)	Amplitude	Acesso nº
DK01	(AG)19	F: CGGCATGAAGGAATAAGGAA R: GCTCACATTCCAACCAATCA	60	165	DQ097469
DK06	(AG)19	F: CGGCATGAAGGAATAAGGAA R: GCTCACATTCCAACCAATCA	60	165	DQ097474
DK11	(GA)16	F: ATGTTTCAGGGGTTCCATTG R: TCACTCGTCTTGCCTTTCC	60	161	DQ097479
DK12	(GA)14	F: AGATGGAGTGACAGAGACTG R: CCCCTTAAGTCTTAGCTAATTAC	53	165	DQ097480
DK13	(GA)13	F: GTAATTAGCTAAGACTTAAGGGG R: TGCTACAACAACCTGGAAGAC	53	141	DQ097481
DK16	(GA)12	F: ACTACAACGGCGGTGAGAAC R: GTCCTTCACTTCCCGCATT	53	153	DQ097484
DK22	(GA)22	F: ATGAGAGAGAGAGAATGATTGATGC R: CATTGTCACGCAGTGAGAT	60	150	DQ097490
DK26	(GA)15	F: GGGAAATTAAGAGGGAAGAA R: AGGAACTGGATCAGCATAA	55	160	DQ097494
DK29	(CCTTT) 8	F: ATCATGACATCAGAGCCGTC R: CACGTTAACGTTACGGAACA	57	131	DQ097497
DK31	(CT)15	F: AGTTCTTGCGATGGCATTG R: GATGAGATGGCTGATTGCT	60	190	DQ097499
DK33	(GA)15	F: ACAGGGCACGAACAGATGAC R: GCAAAATGGTCTGGACTGCT	60	240	DQ097501
DK36	(GA)16	F: GGGAAGAACAAGAGAAGACTG R: ACGAAGTTGTAATCCTGAGC	54	227	DQ097504

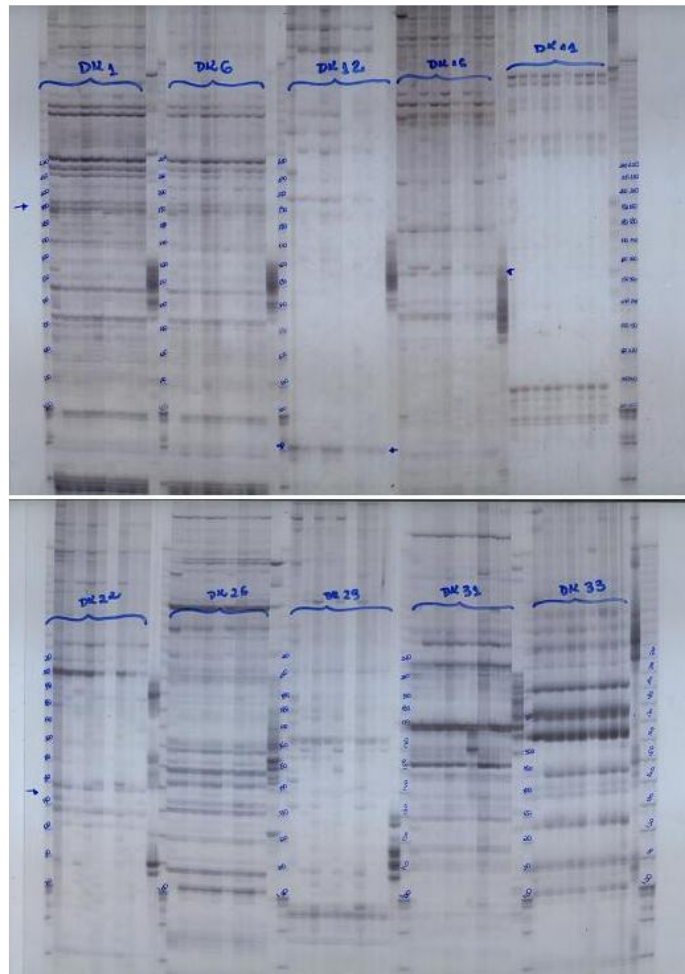


Figura 17 – Teste de temperatura de anelamento ( $T_a$ ) para transferência de *primers* de *D. kaki* para *D. hispida*

#### 5.4 Desenvolvimento de biblioteca enriquecida com microssatélites

A partir da biblioteca genômica (Figura 18), 28 colônias recombinantes foram seqüenciadas e em cinco colônias não foram encontrados microssatélites; desse modo foram obtidos 23 microssatélites, no entanto 10 desses microssatélites não puderam ser desenhados, pois encontravam-se muito no início ou no final do seqüenciamento.

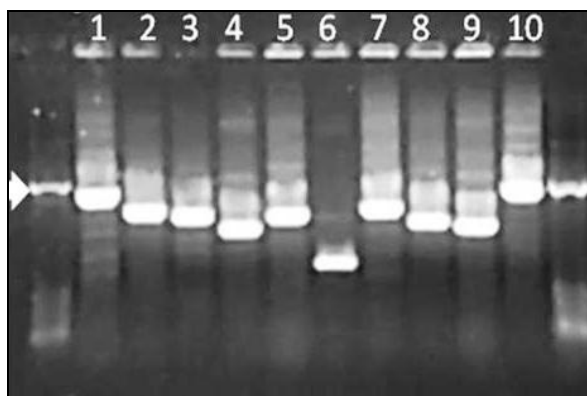


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo a amplificação de 10 clones da biblioteca (1 a 10). A amplificação desses clones foi realizada com o *primer Rsa 21* complementar a sonda utilizada na construção da biblioteca. A primeira e a última coluna correspondem ao *ladder* 10pb, que nesse caso apresentam como bandas mais fortes as de 330pb (seta branca)

Os 13 *primers* desenhados (Tabela 1) foram testados em 12 diferentes temperaturas de anelamento: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 63, 64, 65, 66 e 67°C em géis de agarose a 1% corados com brometo de etídeo (Figura19), no entanto somente sete *primers* foram utilizados nesse estudo e suas respectivas temperaturas de anelamento encontram-se na Tabela 6.

Dos 13 *primers* obtidos, nove têm motivos dinucleotídeos perfeitos, e quatro *primers* têm motivos compostos, dentre esses estão os sete *primers* utilizados no estudo (Tabela 6).

Tabela 6 - Locos microssatélites utilizados nesse estudo, com os motivos, as seqüências dos *primers*, as amplitudes alélicas em pares de base e as temperaturas de anelamento em graus Celsius ( $T_a$ )

Loco	Motivo	Seqüência do <i>primer</i> (5'-3')	Amplitude (pb)	$T_a$ (°C)
DH 1	(AC) <sub>7</sub>	F: CGCGTGGACTAACTCAGGA R: GATGAAAAGGAGCCTGGAGA	190	67
DH1-1	(CA) <sub>6</sub>	F: ACGCAGCAAAAATACTCAACC R: ATTTGAGACCCGATCTGTGG	228	60
DH 2B	(TG) <sub>8</sub> (TA) <sub>2</sub> CA(TA) <sub>3</sub>	F: CCCACCAAACAGCATAAAGAA R: ATAGATAACCGACCGCCAAC	177	60
DH 9	(TA) <sub>5</sub> GA(TA) <sub>4</sub> (TG) <sub>12</sub>	F: TCTTGTTGCATTGGGTGTA R: GGTTGAGACAACATGACTGG	168	62
DH D3	(TA) <sub>4</sub>	F: CCCTAAACTAAACCGCTTC R: CGTGTTGATGCAGGTAAACA	192	60
DH E3	(GT) <sub>19</sub>	F: TCGATTCTCTTGCTTACGC R: CATGTAAGGCCACAGGAA	102	TD
DH F2	(GC) <sub>2</sub> (GT) <sub>9</sub> (CG) <sub>8</sub>	F: CTCTCTGTGCTTGGTCGTCT R: ATCTCCACTCCCCGACT	279	60

TD – Programa de PCR do tipo Touchdown.

## 5.5 Caracterização dos locos microssatélites

### (A) Estação Ecológica de Itirapina

Para todos os indivíduos genotipados da EEI foi obtido um total de 26 alelos (Tabela 7), sendo que desses seis alelos foram raros, ou seja, com frequência abaixo de 0,05 e outros 10 alelos foram exclusivos (Tabela 11). O polimorfismo foi baixo para a maioria dos locos, inclusive com a fixação do loco DH 1-1; os locos variaram de um alelo para o loco DH 1-1 a 10 alelos para o loco DH 2B, com média de 3,7 alelos por loco polimórfico, (Tabela 7). Quatro locos apresentavam-se fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, os outros três locos não foram calculados. O índice de fixação foi, em média, significativamente negativo ( $\hat{f}_i = -0,376$ ). A heterozigozidade observada teve um valor médio de 0,521 e foi maior do que a heterozigozidade esperada, que teve um valor médio de 0,379 (Tabela 7).

A média do poder de não exclusão dos parentais foi alta, mas as análises combinadas para o conjunto de dados (sete locos para 100 indivíduos) resultou em 0,04, ou seja, 4% de probabilidade de não exclusão; sob essas condições, as análises de paternidade terão baixo erro associado. A mesma divergência foi vista para o poder de não exclusão da identidade clonal, cuja média também foi alta (Tabela 7), porém as análises combinadas para o conjunto de dados (sete locos para 100 indivíduos) resultaram em 0,001, ou seja, 0,1% de probabilidade de não exclusão; sendo assim as análises de identificação clonal também terão baixo erro associado.

Para a identificação dos clones o programa CERVUS foi utilizado; esse programa faz análises par a par para a identificação dos clones, assim sendo, em 4950 pares analisados, detectou-se 527 pares compostos por clones. Depois de fazer manualmente o agrupamento dos rametes que possuíam os mesmos genótipos, foi possível detectar 73 rametes, ou seja, de um total de 100 indivíduos tem-se 27 genetes.

Foi observado desequilíbrio de ligação ( $p$ -valor), calculado pelo programa F<sub>STAT</sub>, baseado em 420 permutações ajustadas ao nível de 5%; esse procedimento ocorre por meio de diversas associações entre genótipos de dois locos e a cada nova associação a estatística é recalculada. O resultado do  $p$ -valor foi de 0.002381 (Tabela 8), esse valor foi observado em somente três pares de locos, para seis pares de locos não foi possível efetuar os cálculos, já que todos eles pareavam-se com o loco DH 1-1, que está fixado, os doze pares restantes apresentavam desequilíbrio de ligação.



Tabela 7 - Descrição dos locos de SSR nucleares para todos os indivíduos adultos (genetes e rametes) da população da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP

Loco	N	A	$H_o$	$H_e$	EHW	$\hat{f}$ (IC = 95%)
DH 1	100	3	0,520	0,408	**	-0,277
DH 1-1	100	1	0,000	0,000	NC	-
DH 2B	98	10	1,000	0,785	***	-0,276
DH 9	99	4	1,000	0,593	***	-0,691
DH D3	94	2	0,947	0,501	***	-0,898
DH E3	99	2	0,081	0,096	NC	0,162
DH F2	79	4	0,101	0,273	NC	0,631
<b>Média</b>	<b>95,57</b>	<b>3,71</b>	<b>0,521</b>	<b>0,379</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

N= número de indivíduos amostrados; A= número alelos;  $H_o$ = heterozigosidade observada;  $H_e$ = diversidade gênica;  $P(Ex_{12})$ = probabilidade de não exclusão combinada do pai 1 e 2;  $P(Ex_1)$ = probabilidade de não exclusão para identidade clonal; EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \*\*\* = significativo 0,01; \*\* = significativo a 0,05; NC= não calculado;  $\hat{f}$  = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos

Tabela 8 - Teste de desequilíbrio de ligação para seis locos de *D. hispida* com os genetes e rametes da população da EEI

Combinação de locos	p-valor limite	p-valor
DH 1 X DH 1-1	0,002381	NC
DH 1 X DH 2B	0,002381	0,00238
DH 1 X DH 9	0,002381	0,02619
DH 1 X DH D3	0,002381	0,00714
DH 1 X DH E3	0,002381	0,00714
DH 1 X DH F2	0,002381	0,44286
DH 1-1 X DH 2B	0,002381	NC
DH 1-1 X DH 9	0,002381	NC
DH 1-1 X DH D3	0,002381	NC
DH 1-1 X DH E3	0,002381	NC
DH 1-1 X DH F2	0,002381	NC
DH 2B X DH 9	0,002381	0,00238
DH 2B X DH D3	0,002381	0,02857
DH 2B X DH E3	0,002381	0,48571
DH 2B X DH F2	0,002381	0,05238
DH 9 X DH D3	0,002381	0,00238
DH 9 X DH E3	0,002381	0,16667
DH 9 X DH F2	0,002381	0,03571
DH D3 X DH E3	0,002381	0,10238
DH D3 X DH F2	0,002381	0,30476
DH E3 X DH F2	0,002381	0,95238

NC - Não calculado, pois o loco está fixado.

Nas análises dos locos SSR nucleares, removendo os clones da população (Tabela 9), houve mudança nas freqüências alélicas, na heterozigosidade observada e esperada, no índice de fixação ( $\hat{f}_i = -0,209$ ); houve um pequeno aumento no poder de não exclusão combinado



$P(Ex_{12})$ , contudo as análises combinadas para o conjunto de dados (sete locos para 27 indivíduos) resultou em 0,01, ou seja, em 1% de probabilidade de não exclusão. Não foi possível efetuar o cálculo para o equilíbrio de Hardy-Weinberg devido ao baixo número de genes.

Tabela 9 - Descrição dos locos de SSR nucleares para os 27 genes da população da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP

Loco	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	$\hat{f}$ (IC = 95%)
DH 1	27	3	0,407	0,338	-0,212
DH 1-1	27	1	0,000	0,000	-
DH 2B	27	10	1,000	0,848	-0,184
DH 9	27	4	1,000	0,625	-0,618
DH D3	27	2	0,185	0,230	-0,857
DH E3	27	2	0,222	0,558	0,198
DH F2	27	4	0,926	0,507	0,607
<b>Média</b>	27	3,71	0,534	0,443	-

*N*= número de indivíduos amostrados; *A*= número alelos; *H<sub>o</sub>*= heterozigosidade observada; *H<sub>e</sub>*= diversidade gênica;  $P(Ex_{12})$ = probabilidade de não exclusão combinada do pai 1 e 2;  $P(Ex_1)$ = probabilidade de não exclusão para identidade clonal; EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \*\*\* = significativo 0,01; \*\* = significativo a 0,05; NC= não calculado;  $\hat{f}$  = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos

Quando comparamos todos os indivíduos da área (genes e rametes) com apenas os genes, constata-se uma diferença entre os índices de fixação. Neste sentido, observa-se um aumento do índice de fixação no conjunto de genes e rametes em comparação com apenas os genes. Contudo os locos continuaram em desequilíbrio de ligação (Tabela 10).

Tabela 10 - Teste de desequilíbrio de ligação para seis locos de *D. hispida* com os genetes da população da EEI

Combinação dos locos	p - valor limite	p - valor
DH 1 X DH 1-1	0.002381	NC
DH 1 X DH 2B	0.002381	0.30952
DH 1 X DH 9	0.002381	0.85238
DH 1 X DH D3	0.002381	1
DH 1 X DH E3	0.002381	0.54762
DH 1 X DH F2	0.002381	0.58810
DH 1-1 X DH 2 B	0.002381	NC
DH 1-1 X DH 9	0.002381	NC
DH 1-1 X DH D3	0.002381	NC
DH 1-1 X DH E3	0.002381	NC
DH 1-1 X DH F2	0.002381	NC
DH 2B X DH 9	0.002381	0.00238
DH 2B X DH D3	0.002381	0.88095
DH 2B X DH E3	0.002381	0.49524
DH 2B X DH F2	0.002381	0.05476
DH 9 X DH D3	0.002381	1
DH 9 X DH E3	0.002381	0.03810
DH 9 X DH F2	0.002381	0.03810
DH D3 X DH E3	0.002381	0.81905
DH D3 X DH F2	0.002381	1
DH E3 X DH F2	0.002381	0.07857

NC - Não calculado, pois o loco está fixado.

Tabela 11 – Freqüências alélicas observadas em cada loco de *D. hispida* nas populações da EEI e FEA

Locos	Alelos	Itirapina		Assis	
		Genetes e Rame tes	Genetes	Genetes e Rame tes	Genetes
DH 1	188	0,050	0,019	0,017	0,067
	190	0,740	0,796	0,489	0,367
	192	-	-	0,011	0,067
	194	-	-	0,028	0,167
	196	0,210	0,185	0,455	0,333
DH 1-1	228	1	1	1	1
DH 2B	166	0,082	0,093	-	-
	168	0,005	0,019	0,005	0,033
	170	0,026	0,056	-	-
	172	0,367	0,296	-	-
	174	0,051	0,111	-	-
	176	0,087	0,093	0,005	0,033
	178	0,163	0,111	0,495	0,467
	180	0,199	0,185	-	-
	182	0,005	0,019	-	-
	184	0,015	0,019	-	-
DH 9	156	-	-	0,010	0,33
	162	0,414	0,370	-	-
	164	0,086	0,130	0,500	0,500
	170	0,480	0,481	0,490	0,467
	174	0,020	0,019	-	-
DH D3	260	0,527	0,130	0,980	0,933
	270	0,473	0,870	-	-
	280	-	-	0,20	0,067
DH E3	104	0,082	0,204	*	*
	106	0,025	0,074	*	*
	112	0,848	0,630	*	*
	114	0,044	0,093	*	*
DH F2	184	0,051	0,537	0,071	0,333
	190	0,949	0,463	0,929	0,667
N° Total de Alelos	31				

\* Loco não analisado para a população de Assis

### (B) Floresta Estadual de Assis

Todos os indivíduos da população da FEA foram analisados com os mesmos marcadores SSR nucleares utilizados para a população da EEI, com exceção do loco DH E3, que não foi utilizado nas análises, pois ainda requer mais testes de temperatura de anelamento, para obter géis livres de bandas inespecíficas. O número de alelos obtidos foi menor do que o encontrado para a população da EEI, obtendo-se um total de 18 alelos (Tabela 12), sendo que desses seis alelos foram raros e cinco alelos foram exclusivos (Tabela 11).

O polimorfismo foi menor nesta população e o loco DH 1-1 permaneceu fixado. O número de alelos variou de um para o loco DH 1-1 a seis para o loco DH 1, com média de 3 alelos por loco (Tabela 12).

Tabela 12 - Descrição dos locos de SSR nucleares para os indivíduos da população da Floresta Estadual de Assis, Assis-SP

Loco	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	EHW	$\hat{f}$ (IC = 95%)
DH 1	88	6	0,625	0,562	NS	-0,103
DH 1-1	100	1	0,000	0,000	NC	-
DH 2B	97	4	1,000	0,513	***	-0,960
DH 9	98	3	1,000	0,513	***	-0,960
DHD3	100	2	0,000	0,039	NC	1,000
DH F2	91	2	0,033	0,133	NC	0,754
<b>Média</b>	95,66	3	0,443	0,293	-	-

*N*= número de indivíduos amostrados; *A*= número alelos; *H<sub>o</sub>*= heterozigosidade observada; *H<sub>e</sub>*= diversidade gênica;  $P(Ex_{12})$ = probabilidade de não exclusão combinada do pai 1 e 2;  $P(Ex_1)$ = probabilidade de não exclusão para identidade clonal; EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \*\*\* = significativo 0,01; \*\* = significativo a 0,05; NC= não calculado;  $\hat{f}$  = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos

A heterozigosidade observada variou de 0,033 (DH F2) a 1 (DH 2E e DH 9), com média de 0,443. A heterozigosidade esperada variou de 0,039 (DH D3) a 0,562 (DH1) com média de 0,293 alelos por loco. O primeiro loco estava em equilíbrio Hardy-Weinberg, dois locos apresentavam-se fora desse mesmo equilíbrio e para três locos não foi possível calcular, provavelmente porque alguns alelos têm baixa frequência. O índice de fixação foi, em média, significativamente negativo ( $\hat{f}_i = -0,512$ ) (Tabela 12).

Na população de Assis a média do poder de não exclusão dos parentais (Tabela 12) foi alta, mesmo com as análises combinadas para o conjunto de dados (seis locos para 100 indivíduos) que resultou em 0,25, ou seja, 25% de probabilidade de não exclusão, sob essas condições, as análises de paternidade terão grande erro associado. Quando avaliou-se a média do poder de não exclusão da identidade clonal, obteve-se um alto valor, no entanto as análises combinadas para o conjunto de dados (seis locos para 100 indivíduos) resultou em 0,02, ou

seja, 2% de probabilidade de não exclusão, dessa forma as análises de identificação clonal terão baixo erro associado.

Para a identificação dos clones utilizou-se o programa CERVUS, esse programa faz análises par a par para a identificação dos clones, assim sendo, em 4950 pares analisados, detectou-se 1834 pares compostos por clones. Depois de fazer manualmente o agrupamento dos rametes que possuíam os mesmos genótipos, foi possível detectar 85 rametes, ou seja, de um total de 100 indivíduos tem-se 15 genetes.

Assim como em Itirapina, a população de Assis também apresentou desequilíbrio de ligação para alguns pares de locos, verificado através do  $p$ -valor calculado pelo programa  $F_{STAT}$ , baseado em 300 permutações ajustadas ao nível de 5% fornecendo um resultado de 0.003333 (Tabela 13). Esse valor foi observado em somente um par de loco, sendo que para cinco pares de locos não foi possível efetuar os cálculos, já que todos eles pareavam-se com o loco DH 1-1, que está fixado, os nove pares restantes apresentavam desequilíbrio de ligação.

Tabela 13 - Teste de desequilíbrio de ligação para seis locos de *D. hispida* para a população de Assis, Assis- SP

Combinação dos locos	$p$ - valor limite	$p$ - valor
DH 1 X DH 1-1	0.003333	NC
DH 1 X DH 2B	0.003333	0.48667
DH 1 X DH 9	0.003333	0.09333
DH 1 X DH D3	0.003333	0.16000
DH 1 X DH F2	0.003333	0.53333
DH 1-1 X DH 2B	0.003333	NC
DH 1-1 X DH 9	0.003333	NC
DH 1-1 X DH D3	0.003333	NC
DH 1-1 X DH F2	0.003333	NC
DH 2B X DH 9	0.003333	0.04000
DH 2B X DH D3	0.003333	0.09000
DH 2B X DH F2	0.003333	0.01000
DH 9 X DH D3	0.003333	0.00333
DH 9 X DH F2	0.003333	0.33667
DH D3 X DH F2	0.003333	0.30667

NC - Não calculado, pois o loco está fixado.

Nas análises dos locos SSR nucleares, removendo-se os clones da população (Tabela 14), houve mudança nas frequências alélicas, um aumento na riqueza alélica, na heterozigosidade observada e esperada, houve também mudanças no valor do índice de

fixação ( $\hat{f}_i = -0,115$ ) e uma diminuição do poder de não exclusão combinado  $P(Ex_{12})$  (Tabela 14), mas as análises combinadas para o conjunto de dados (seis locos para 15 indivíduos) resultou em 0,08, ou seja, 8% de probabilidade de não exclusão.

Não foi possível efetuar o cálculo para o equilíbrio de Hardy-Weinberg devido ao baixo número de genes; contudo os locos continuaram em desequilíbrio de ligação (Tabela 15).

Tabela 14 - Descrição dos locos de SSR nucleares para os 15 genes da população da Floresta Estadual de Assis, Assis-SP

Loco	N	A	$H_o$	$H_e$	$\hat{f}$ (IC = 95%)
DH 1	15	6	0,600	0,743	0,197
DH 1-1	15	1	0,000	0,000	-
DH 2B	15	4	1,000	0,528	-0,765
DH 9	15	3	1,000	0,549	-0,875
DHD3	15	2	0,133	0,460	1,000
DH F2	15	2	0,000	0,129	0,717
<b>Média</b>	15	3	0,455	0,401	-

N= número de indivíduos amostrados; A= número alelos;  $H_o$ = heterozigosidade observada;  $H_e$ = diversidade gênica;  $P(Ex_{12})$ = probabilidade de não exclusão combinada do pai 1 e 2;  $P(Ex_1)$ = probabilidade de não exclusão para identidade clonal; EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \*\*\* = significativo 0,01; \*\* = significativo a 0,05; NC= não calculado;  $\hat{f}$  = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos

Tabela 15 - Teste de desequilíbrio de ligação para seis locos de *D. hispida* com os genes da população da FEA

Combinação dos locos	p - valor limite	p - valor
DH 1 X DH 1-1	0.003333	1
DH 1 X DH 2B	0.003333	1
DH 1 X DH 9	0.003333	1
DH 1 X DH D3	0.003333	1
DH 1 X DH F2	0.003333	1
DH 1-1 X DH 2B	0.003333	NC
DH 1-1 X DH 9	0.003333	NC
DH 1-1 X DH D3	0.003333	NC
DH 1-1 X DH F2	0.003333	NC
DH 2B X DH 9	0.003333	0.09333
DH 2B X DH D3	0.003333	0.09333
DH 2B X DH F2	0.003333	0.41000
DH 9 X DH D3	0.003333	0.05000
DH 9 X DH F2	0.003333	0.42667
DH D3 X DH F2	0.003333	0.36667

NC - Não calculado, pois o loco está fixado.

### **5.6 Diversidade e heterogeneidade clonal**

A diversidade clonal ( $DC$ ) é a proporção de genetes existentes em uma determinada população e seu valor pode variar de zero a um. Para a população da EEI a  $DC$  encontrada foi de 0,26 e na população da FEA foi encontrada uma  $DC$  de 0,14.

A heterogeneidade clonal ( $D^*$ ) refere-se à distribuição da diversidade dentro da população. Na população da EEI a  $D^*$  encontrada foi de 0,95 e para a população da FEA o valor encontrado foi de 0,81.

### **5.7 Estrutura genética espacial**

Foi detectada pequena EGE nas menores classes de distância para o conjunto de genetes e rametes analisados de ambas as populações. Para a população da EEI a EGE é encontrada até 123m, ressaltando que a população tem classes de distância bem maiores quando comparada a população da FEA, pois ocupa maior área. Para a população da FEA a EGE é encontrada na menor classe de distância, ou seja, é significativa até 1m (Figura 19).

As classes de distância utilizadas foram escolhidas pelo respectivo programa mantendo sempre um número mínimo de 247 pares de dados.

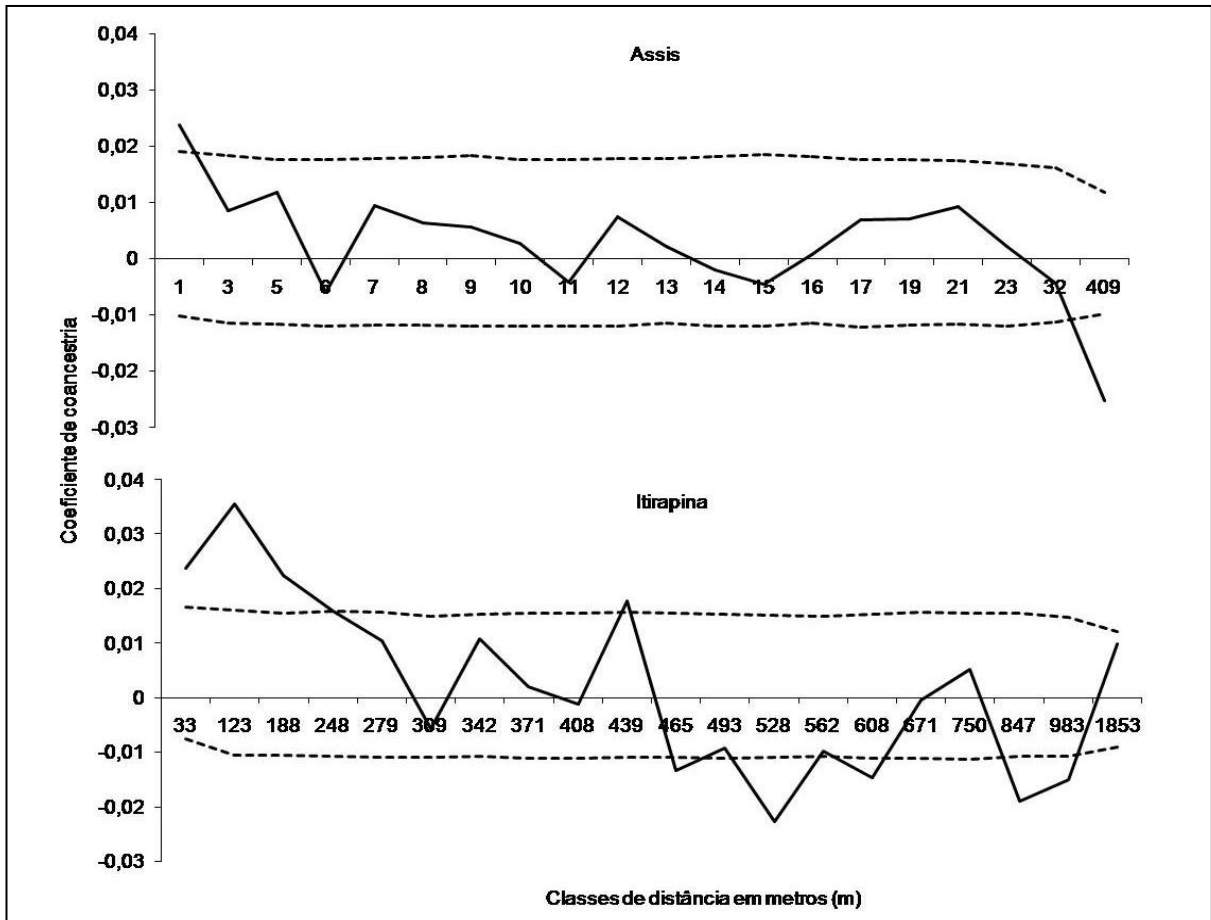


Figura 19 - Correlograma do coeficiente de coancestria em 20 classes de distância, para indivíduos de *D. hispida*. As linhas pontilhadas indicam intervalo de confiança de 95% de probabilidade





## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Estrutura Demográfica

Através dos resultados apresentados na Tabela 2, pode-se observar que as árvores de *D. hispida* têm maior porte na FEA quando comparada as árvores da EEI esse fator provavelmente é resultado das restrições edáficas e também da presença do fogo que são mais acentuados na EEI (RATTER et al., 2003; TOPPA, 2004).

A EEI apresenta solos com baixa disponibilidade de nutrientes e altos teores de alumínio (MIRANDA-MELO et al., 2007), característico de cerrado *stricto sensu*, que também tem acentuada proporção de areia diminuindo a retenção de água no solo (TOPPA, 2004); sendo assim os indivíduos de *D. hispida* provavelmente agrupam-se em locais com condições favoráveis a sobrevivência.

Na FEA as restrições edáficas são menores, como o esperado para a fisionomia local (predomínio de cerradão); desse modo, o solo oferece maior disponibilidade de nutrientes e também maior capacidade na retenção de água, pois tem baixa porosidade. Esses fatores favorecem o desenvolvimento das árvores de *D. hispida*, sendo assim, as propriedades granulométricas e químicas do solo influenciam na estrutura e distribuição espacial das espécies (RATTER et al., 2003; TOPPA, 2004).

As queimadas que normalmente ocorrem na estação seca também alteram a densidade de plantas e modificam bastante a morfologia e a estrutura da casca das espécies lenhosas, queimando o súber e tornando a forma mais irregular após a passagem do fogo (FELFILI et al., 2000), desse modo a presença do fogo na EEI pode ser outro fator que influenciou no menor porte dos indivíduos de *D. hispida*.

A distribuição espacial dos indivíduos de *D. hispida* é agregada em ambas as populações estudadas. Esse resultado corrobora com outros estudos realizados no Cerrado, onde muitas espécies também apresentam distribuição espacial agregada (LIMA-RIBEIRO; PRADO, 2007; LIMA-RIBEIRO, 2007). Segundo Condit et al. (2000), a maioria das espécies vegetais tropicais ocorre de forma agregada e essa agregação pode ser causada, em parte, pela dispersão restrita de sementes e também por propagação vegetativa. Dentre essas possibilidades pode-se fazer algumas inferências sobre *D. hispida*.

O padrão de distribuição observado em campo é característico de quiropterocoria e barocoria. A quiropterocoria é a dispersão de sementes por morcegos, sendo esses um dos potenciais dispersores de *D. hispida* (WALLNÖFER, 2001); eles possuem poleiros de

alimentação dispersando as sementes próximas as árvores-mãe, desse modo indivíduos geneticamente semelhantes germinam próximos uns dos outros. Porém cabe ressaltar que os morcegos têm longo alcance de vôo, dispersando as sementes ingeridas que passaram pelo seu trato digestivo longe das árvores-mãe, sendo assim deve-se encontrar maior diversidade genética entre as subpopulações do que dentro das mesmas, sob esse aspecto seria necessário realizar estudos envolvendo todas as subpopulações de ambos os locais estudados.

A barocoria que é a dispersão por gravidade (Figura 20), assim como os poleiros de alimentação dos morcegos, favorece a germinação de indivíduos geneticamente semelhante sob a copa da árvore-mãe, justificando assim a presença de indivíduos agrupados e com genótipo semelhante. Esses resultados apontam para a necessidade do desenvolvimento de estudos avaliando o sistema reprodutivo dessas populações.

As queimadas também podem favorecer a germinação de sementes próximas as plantas-mãe, isso porque a retirada da cobertura vegetal do solo favorece a germinação de sementes de *D. hispida*, sendo assim as plântulas podem se desenvolver, já que o fogo elimina também os herbívoros e os patógenos microbianos do solo (KUNST et al., 2003), sobre esse aspecto pode-se incluir os indivíduos da EEI.



Figura 20 – Fruto de *D. hispida* caído sob a copa da árvore-mãe.  
Fonte: TARAIZI, R., 2008

Os fatores acima descritos podem estar presentes nas duas populações, porém o baixo polimorfismo e conseqüente baixa variabilidade genética associada à grande quantidade de

indivíduos compartilhando o mesmo genótipo dão fortes indícios da possível atuação da propagação nas populações estudadas.

## **6.2 Estrutura genética espacial**

A EGE é a distribuição não aleatória dos genótipos dentro de uma população e pode ser causada pela dispersão de sementes e pólen próximo a árvore matriz, facilitando o cruzamento entre indivíduos aparentados (VEKEMANS; HARDY, 2004). Dentro desse contexto, a dispersão de pólen a curtas distâncias e a propagação vegetativa podem ser fatores agravantes para a população.

Através da Figura 19 pode-se observar a existência de uma fraca EGE em ambas as populações, sendo esse um resultado esperado para espécies com sistemas reprodutivos que incluem a auto-compatibilidade (VENKEMANS; HARDY, 2004). Esse fato pode estar relacionado com a distribuição espacial do tipo “Guerrilla”; nesse caso os rametes (genótipos) são amplamente distribuídos por toda a população e geralmente distribuem-se de forma aleatória (LOVET DOUST, 1981). Essa distribuição espacial foi observada para *D. hispida* e, mesmo havendo agregação espacial dos indivíduos, pode-se notar que os agrupamentos são formados por diferentes genótipos (Figuras 21 e 22). Resultados semelhantes foram encontrados por Ohsako (2010), que estudou *Carex kobomugi* (Cyperaceae) e obteve baixa diversidade clonal e genótipos bem distribuídos nas parcelas estudadas.



Figura 21 – Disposição dos indivíduos de *D. hispida* na EEI. As diferentes cores representam os diferentes genótipos. A numeração é correspondente ao número do indivíduo de *D. hispida*.

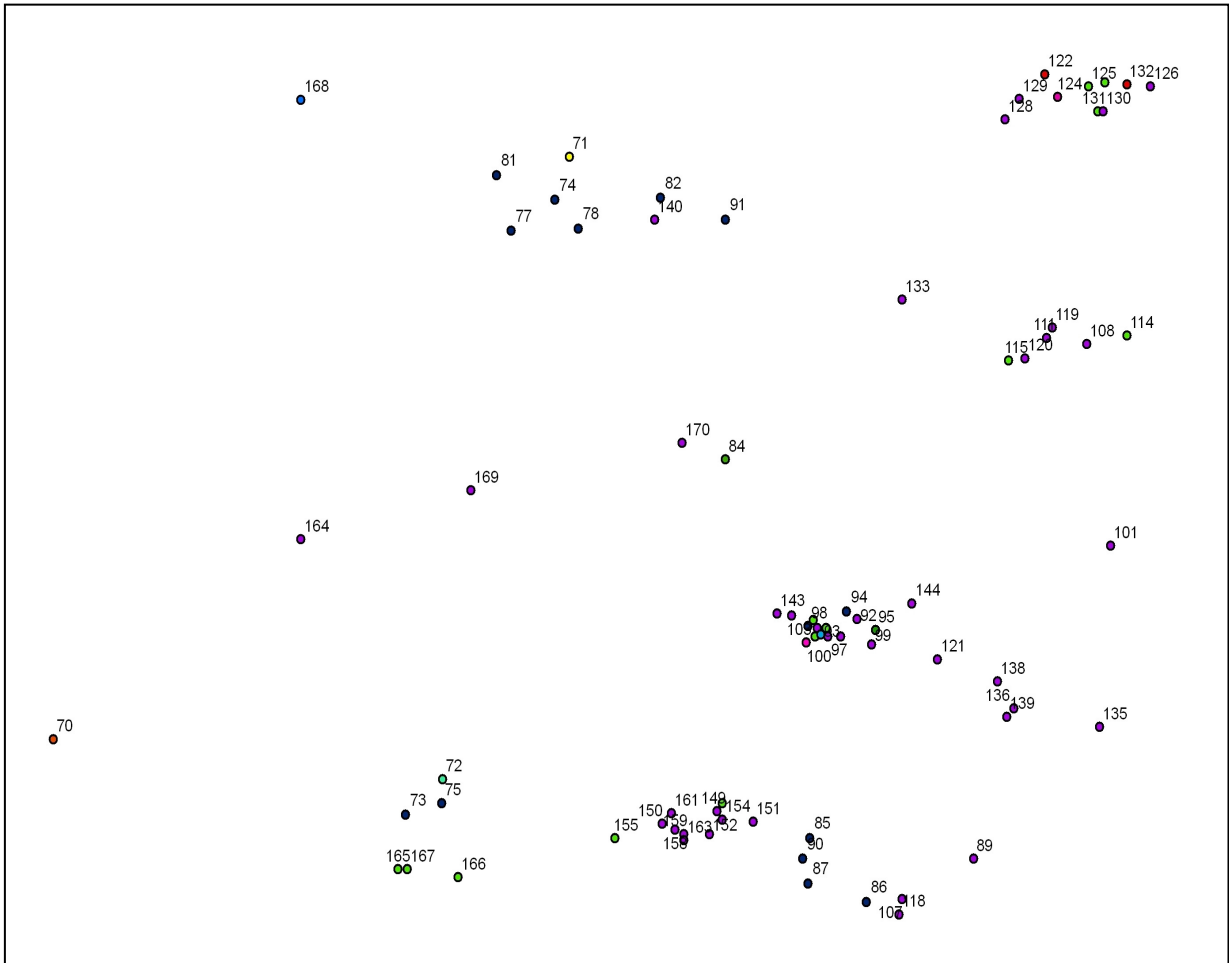


Figura 22 – Disposição dos indivíduos de *D. hispida* na FEA. As diferentes cores representam os diferentes genótipos. A numeração é correspondente ao número do indivíduo de *D. hispida*.

De modo geral, os rametes da população da FEA apresentaram uma distância média de 12,76 m entre os indivíduos de mesmo genótipo. Os rametes da população da EEI apresentaram uma distância média de 11,80 m entre os indivíduos de mesmo genótipo. Nesse sentido a alta heterogeneidade clonal encontrada em ambas as populações de *D. hispida* foi devido à grande miscigenação dos genetes e rametes no espaço, contudo em alguns casos foi verificado que os genetes e seus respectivos rametes pertenciam a uma mesma reboleira.

É importante que existam diferentes genótipos na população, principalmente se os rametes femininos e masculinos estiverem próximos, pois a espécie é polinizada por pequenos lepidópteros que possuem curto alcance de vôo e desse modo a diversidade genética da população deve ser aumentada, desde que o cruzamento ocorra entre indivíduos não aparentados (OHSAKO, 2010).

Um possível fator que deve ter atuado nas populações foi a agamospermia, que tem ampla ocorrência no Cerrado (AMORIM; OLIVEIRA, 2006; MONTORO; SANTOS, 2007; VIEIRA; CARVALHO, 2009). Através das Figuras 21 e 22 observa-se que alguns rametes com genótipos idênticos estão distante entre si e possivelmente esses frutos foram dispersos longe da planta mãe.

Dentro desse contexto, é possível observar que a fraca EGE encontrada para *D. hispida* é em consequência das reboleiras serem formadas por indivíduos com diferentes genótipos. Resultados opostos foram observados por Moreno (2009) estudando *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado), e concluiu que a EGE na espécie estava fortemente correlacionada com a dispersão restrita de sementes. Na população de Itirapina a autora citada observou a presença de irmãos-clonais até 1m de distância e irmãos-completos até 5m de distância; já para população de Assis a EGE foi significativa até 750m de distância com indivíduos relacionados no grau de primos. Braga; Collevatti (2009) estudaram *Tabebuia aurea* (ipê-amarelo) e observaram que a EGE é relacionada à dispersão da semente; em indivíduos jovens (não reprodutivos) as menores classes de distância possuem maior grau de parentesco, já para os indivíduos adultos (reprodutivos) a EGE é menor para as mesmas classes de distância analisadas nos indivíduos jovens.

### **6.3 Diversidade genética em espécies com populações apresentando potencial para propagação vegetativa**

Em ambas as populações estudadas a baixa diversidade genética foi observada pelo baixo polimorfismo decorrente do reduzido número de alelos por loco. Essas estimativas foram influenciadas pelo grande número de indivíduos compartilhando o mesmo genótipo, desse modo foram observados 73 indivíduos com essas características na população da EEI e 85 indivíduos na população da FEA.

A maior diversidade genética encontrada na EEI pode ser resultado da queimada que pode ter favorecido a germinação de sementes, pois a remoção da cobertura vegetal aumenta a incidência de luz (KUNST et al., 2003) proporcionando a germinação de sementes de *D. hispida*, garantindo maior diversidade genética na população quando as sementes forem decorrentes de cruzamentos.

O reduzido número de alelos por loco, o excesso de indivíduos heterozigóticos e a ocorrência de desequilíbrio de ligação nas duas populações estudadas podem ser decorrentes de duas possíveis causas: propagação vegetativa por raízes e por agamospermia.

A agamospermia possivelmente atuou em ambas as populações, indícios dessa atuação podem ser vistos na Figura 21 e 22, onde alguns indivíduos com genótipo idêntico estavam distantes uns dos outros e isso provavelmente ocorreu porque esses frutos foram dispersos longe da planta-mãe. O fato de existir indivíduos de *D. hispida* com genótipos idênticos e distantes nas populações, pode ser atribuído também à propagação vegetativa. São necessários estudos morfológicos das raízes de *D. hispida* nos locais de estudo para averiguar se os clones são resultantes de agamospermia ou propagação vegetativa por raízes. A avaliação do sistema de reprodução da espécie também é importante para elucidar essa questão.

O excesso de indivíduos heterozigóticos e, como consequência, valores negativos de  $\hat{f}$  podem ser resultantes de antigas linhagens assexuais mais heterozigotas do que as linhagens sexuais. Sob esse aspecto Judson; Normark (1996) descrevem três possíveis razões para o excesso de heterozigotos: ao longo do tempo antigos genótipos devem ter acumulado mutações neutras independentes; a heterozigosidade não pode ser perdida através da recombinação sexual; antigos genótipos podem ter sido expostos a seleção ao longo do tempo, desse modo, os genótipos heterozigotos devem ter tido vantagens sobre os genótipos homozigotos. Contudo é necessário ressaltar que em longo prazo podem existir alterações na quantidade de heterozigotos, porque podem ocorrer variações na reprodução assexual entre indivíduos e entre gerações (STOECKEL et al., 2006).

O desequilíbrio de ligação encontrado em quase todos os pares de locos avaliados pode ser em decorrência de muitos genótipos iguais indicando a possível influência da propagação vegetativa. Por isso, faz-se necessário mencionar que, para verificar a eficácia dos *primers* desenvolvidos seria necessário realizar a coleta de pelo menos 30 indivíduos distantes uns dos outros e submetê-los às mesmas análises aqui realizadas.

Ainda em relação ao desequilíbrio de ligação, alguns autores dizem que populações que sofreram recentes reduções no tamanho populacional podem apresentar-se em desequilíbrio (FLINT-GARCIA, 2003; MEEÛS; BALLOUX, 2004; CALDWELL et al., 2006). Nesse caso poderia incluir-se a população da EEI, pois em 2009 a área estudada foi incendiada, o que pode favorecer a germinação de sementes presentes no solo. Se as sementes forem decorrentes de cruzamento entre indivíduos não aparentados a diversidade genética da



população pode ser aumentada (SILVERTOWN, 2008). Isso pode ter ocorrido na população, pois apresentou maior diversidade genética; contudo, pode-se observar que o fogo também favoreceu a propagação vegetativa, isso porque pouco tempo depois foram observados diversos indivíduos em intensa brotação (Figura 23).



Figura 23 – Rebrotas de indivíduos de *D. hispida* na população da EEI após o fogo

Assim como em *D. hispida*, o fogo tem grandes influências sobre o sistema reprodutivo de diversas espécies; Hoffmann (1998) estudou várias espécies características de cerrado e observou que dentre essas espécies, *Rourea induta*, *Myrsine guianensis* e *Roupala montana* tiveram produção de brotos de sete a 15 vezes maior nas parcelas queimadas quando comparadas às parcelas não queimadas e somente *Piptocarpha rotundifolia* apresentou aumento na produção de sementes após a queimada. De modo geral os resultados do estudo relatado indicaram que, sob determinadas frequências de queimadas, a reprodução vegetativa pode ser mais vantajosa do que a reprodução sexual. Vale e Lopes (2007) estudaram *Kielmeyera coriacea*, *Tabebuia aurea* e *Ouratea hexasperma* e observaram rebrotas após o fogo tanto da parte aérea como de estruturas subterrâneas; os autores citados verificaram ainda que o rebrote da parte aérea era mais comum em indivíduos com no mínimo 1m e 50 cm, indivíduos abaixo dessa altura tinham acentuada rebrota das estruturas subterrâneas.

Nesse contexto uma das prováveis vantagens da propagação vegetativa é que as “plântulas clone” podem crescer mais rapidamente quando comparadas às plântulas decorrentes de sementes; desse modo podem atingir mais rapidamente a altura necessária para se tornarem aptas a sobrevivência aos próximos incêndios. Mais tarde esses indivíduos podem investir energia na expansão da circunferência do tronco (HOFFMANN et al.; 2003).

Os efeitos negativos do fogo sobre as diferentes vias reprodutivas dependem não somente da intensidade e frequência, mas também das características das espécies como porte, fenologia, mecanismos de proteção das sementes e habilidade de rebrota das plântulas garantem o sucesso reprodutivo (GARCÍA-NUÑEZ et al. 2001).

Embora os parâmetros aqui mencionados indiquem a presença de propagação vegetativa, estimativas de parentesco (Figura 24 e 25) indicam que ambas as populações apresentam maior reprodução sexuada, o que pode ser observado através dos valores da coancestria. Para a população da FEA existem indícios de propagação vegetativa a partir da classe 15 e para a EEI a partir da classe 24; essas classes foram obtidas a partir da estimativa:

$\theta_{xx} = \frac{1+f}{2}$ , sendo que o valor de  $f$  para a FEA foi de -0,512 ( $\theta_{xx} = 0,24$ ) e para a EEI -0,376 ( $\theta_{xx} = 0,31$ ).

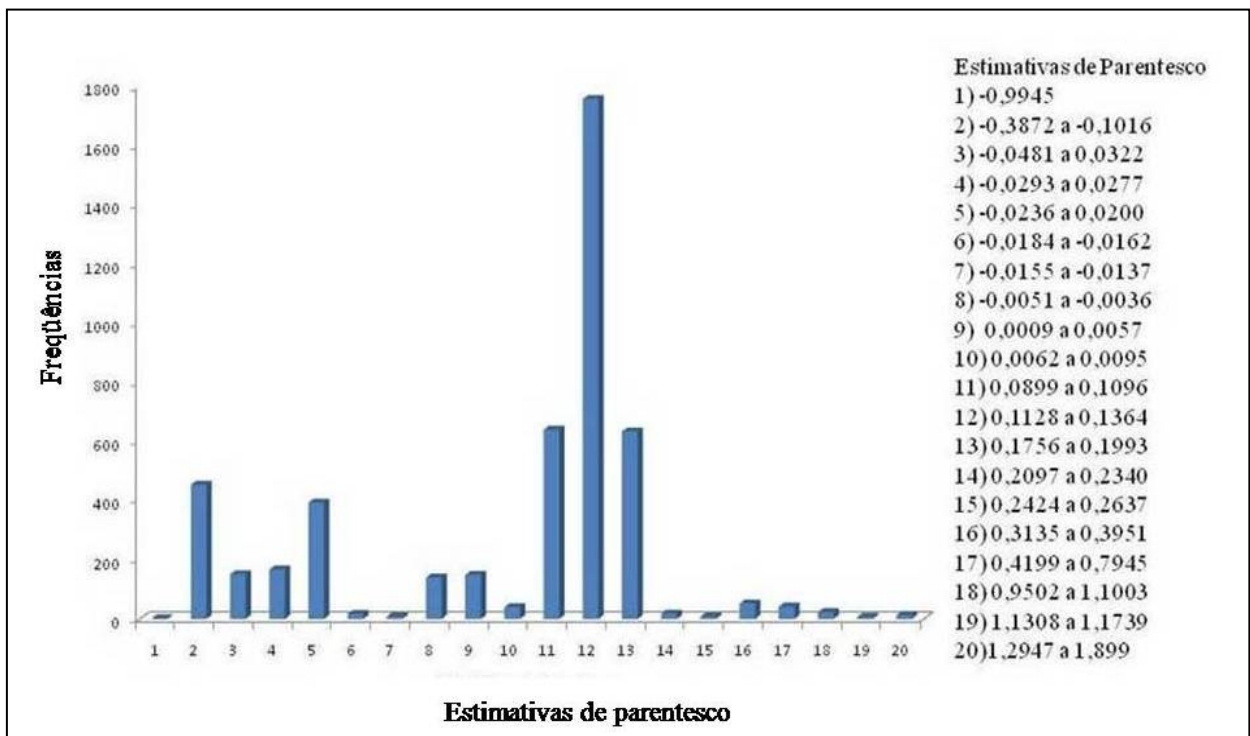


Figura 24 – Estimativas de parentesco para os indivíduos de *D. hispida* da população da FEA

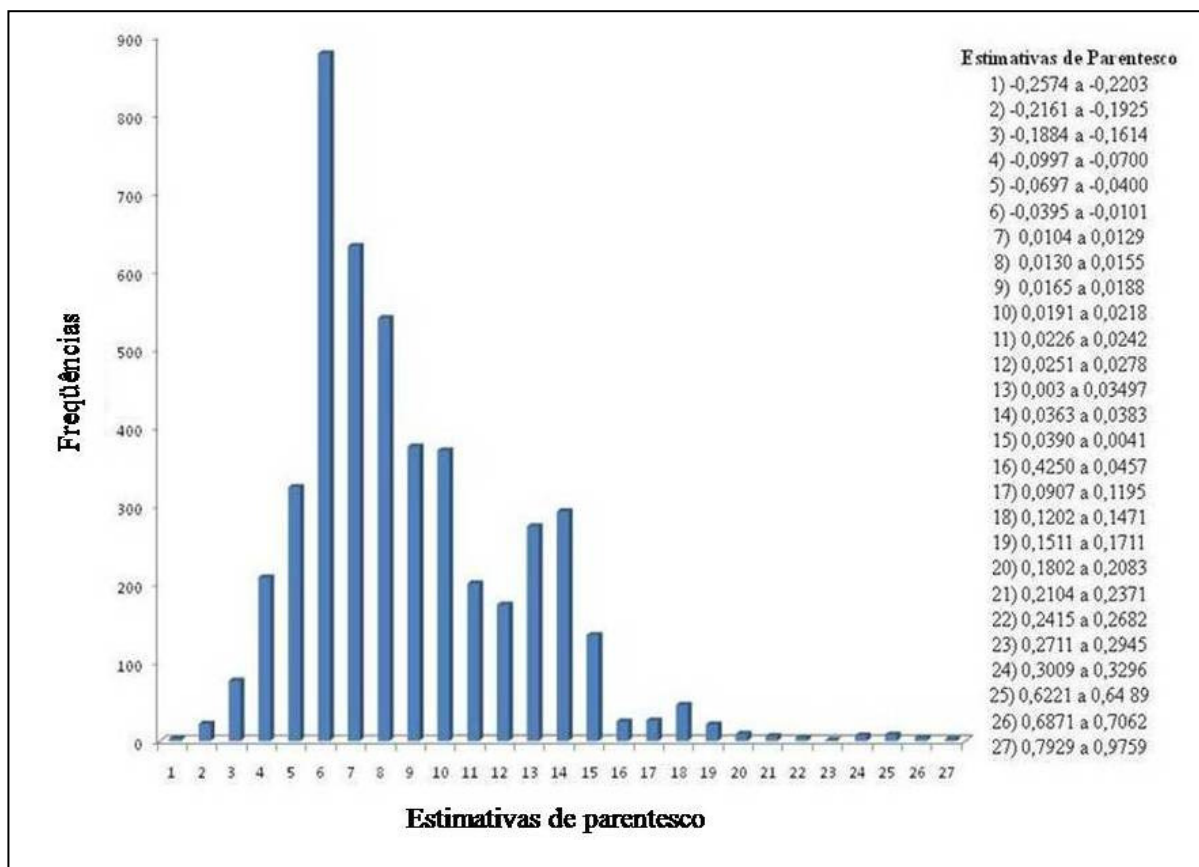


Figura 25 – Estimativas de parentesco para os indivíduos de *D. hispida* da população da EEI

Como foi observada a existência de dois sistemas reprodutivos na espécie, é provável que os cruzamentos estejam ocorrendo entre indivíduos com diferentes genótipos, e no caso de *D. hispida* entre os diferentes sexos; podendo ser entre indivíduos de diferentes rametes, entre indivíduos de diferentes genetes e entre diferentes genetes e rametes. Resultados semelhantes foram observados por Moreno (2009), onde o cruzamento dos indivíduos de *H. stigonocarpa* deu-se entre indivíduos com diferentes genótipos, nesse caso entre as reboleiras, já que eram compostas por indivíduos com o mesmo genótipo.

#### 6.4 Implicações do estudo para conservação da biodiversidade do Cerrado

Ao se propor estratégias de conservação seriam necessárias ações de manejo que proporcionasse a manutenção da diversidade genética de modo a manter o potencial evolutivo. Logo, para fins de conservação *in situ* e *ex situ* seria necessário realizar a identificação de indivíduos machos e fêmeas, bem como coletar sementes de indivíduos

genes e/ou rametes, porém de diferentes genótipos, a fim de maximizar a diversidade alélica, fator importante para bancos de germoplasma. Contudo, por causa da baixa diversidade genética dos indivíduos estudados, seria necessário coletar sementes de outras matrizes localizadas na EEI e FEA, além de áreas de reserva legal (RL) ou em áreas de proteção permanente (APP) no entorno dessas unidades de conservação, demonstrando a importância da manutenção dessas áreas na conservação de *D. hispida* e outras espécies do Cerrado.

A amostragem para coleta de sementes e para bancos de germoplasma deve relevar as características biológicas de *D. hispida*, considerando que existe uma possível ocorrência de agamospermia nas populações estudadas, correndo-se o risco de coletar sementes de árvores distantes, mas com mesmo genótipo. Um meio de evitar a seleção de indivíduos com alguma carga genética que venha diminuir o sucesso reprodutivo das plantas no banco de germoplasma é através da cuidadosa seleção de mudas. Nesse caso devem-se excluir mudas albinas, que exibem má-formação e com crescimento lento, atentando-se em manter o tamanho efetivo mínimo para garantir que os indivíduos tenham condições de sobreviver a possíveis fatores estocásticos.

Programas visando ao enriquecimento, à restauração florestal ou ao melhoramento de *D. hispida* devem contemplar os genótipos da população de cada localidade estudada para que estes programas não sejam comprometidos no futuro com uma falta de adaptação local (CAMPBELL, 1979; BOWER, AITKEN, 2008; MCKAY et al., 2005).

O conhecimento genético da espécie estudada, com pouca informação tanto demográfica quanto reprodutiva e genética na estrutura, mostra a importância das informações aqui apresentadas, mantendo a importância do estudo no Cerrado e apontam para a necessidade de avançar esse conhecimento para a conservação, uso sustentável e restauração do Bioma.

O fato da espécie apresentar propagação vegetativa associada à alogamia, sendo uma espécie dióica, aumenta completamente os estudos genéticos já desenvolvidos no Cerrado.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os *primers* apresentaram desequilíbrio de ligação mostrando um baixo polimorfismo e excesso de indivíduos heterozigotos em ambas as populações; esses parâmetros corroboram com a hipótese da existência da propagação vegetativa.

A fraca EGE encontrada nas duas populações estudadas foi em decorrência da ampla distribuição dos genótipos, confirmada pela alta heterogeneidade clonal.

Os valores da coancestria observados em ambas as populações revelaram a existência de cruzamento, corroborando com diversos trabalhos que incitam a predominância da alogamia, embora haja muitas espécies com sistema misto de reprodução. Esse resultado reforça a importância do desenvolvimento de mais *primers* para a espécie, assim como aumentar a amostragem, avaliando também as subpopulações presentes em ambas as localidades de estudo, desse modo a diversidade genética poderá ser maior entre as subpopulações do que dentro delas.

A agregação em *D. hispida*, além da possível propagação vegetativa, pode ser em decorrência da barocoria e quiropterocoria, contudo, estudos sobre o sistema reprodutivo da espécie, avaliando também as progênies das populações estudadas, seriam necessários para elucidar essa questão.

É necessário realizar a identificação dos indivíduos machos e fêmeas, a fim de se conhecer as proporções de ambos os sexos na população, pois a partir desses dados é possível estimar o tamanho efetivo populacional, assim como determinar a área mínima viável para a conservação.

A coleta de sementes deve ser realizada em indivíduos com diferentes genótipos, sendo importante o mapeamento de outras matrizes dentro das unidades de conservação estudadas e em áreas do entorno das mesmas. Deve-se coletar uma grande quantidade de sementes por árvore, esse número deve ser igual ou aproximadamente igual por matriz, assim é possível maximizar o tamanho efetivo da amostra.



## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.M.S.; MACHADO, R.B.; MARINHO-FILHO, J. A diversidade biológica do cerrado p. 17-38. In: AGUIAR, L.M.S.; CAMARGO, A.J.A. **Cerrado: ecologia e caracterização**. EMBRAPA. Brasília, 2004. 249 p.
- ALVES, R.M.; ARTERO, A.S.; SEBBENN, A.M.; FIGUEIRA, A. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, n.3, p. 373-379, 2003.
- AMORIM, F.W.; OLIVEIRA, P.E. Estrutura sexual e ecologia reprodutiva de *Amaioua guianensis* Aubl.(Rubiaceae), uma espécie dióica de formações florestais de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 353-362, 2006.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Genotyper 2.0**. Califórnia, 1996. 1 CD-ROM.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Genescan 3.7**. Califórnia, 2001. 1 CD-ROM.
- ARNAUD-HAOND S.; BELKHIR, K. GENCLONE 1.0: a new program to analyse genetics data on clonal organisms. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.7, p.15–17, 2007a.
- ARNAUD-HAOND, S.; DUARTE, C.M.; ALBERTO, F.; SERRÃO, E.A. Standardizing methods to address clonality in population studies. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, p.5115–5139, 2007b.
- BALLOUX, F.; LEHMANN, T. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. **Genetics**, Austin, v. 164, p.1635–1644, 2003.
- BARROSO, G.M.. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. São Paulo: Editora EDUSP, 1978. v. 1, 255p.
- BAWA, K.S. Breeding systems of the tree species of a lowland community. **Evolution**, Lancaster, v. 28, p. 85-92, 1974.
- BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees: Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 72, p. 331-345, 1985.
- BEHLING, H.; HOOGHMSTRA, H. Neotropical savanna environments in space and time: late quaternary interhemispheric comparison. In: MARKGRAF, V. (Ed.). **Interhemispheric climate linkages**. Oxford: Academic Press, 2001. p. 307-323,
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, C. Microsatellites-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Les Ulis, v. 54, p. 277-288, 1999.
- BITTENCOURT, J.V.M; SEBBENN, A.M. Pollen movement and spatial genetic structure in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 9, p. 855-868, 2007.



BIZERRIL, M.X.A. **Vivendo no cerrado e aprendendo com ele**. São Paulo: Editora Saraiva, 2004. 79p.

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.

BRAGA, A.C.; COLLEVATTI, R.G. Estrutura genética espacial de *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55., 2009. Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2009. p.21

CAIN, M.L.; DAMMAN, H. Clonal growth and ramet performance in clonal herb, *Asarum canadense* **Journal of Ecology**, Oxford, n. 85, p. 76-85, 1996.

CALDWELL, K.S.; RUSSELL, J.; LANGRIDGE, P.; LANGRIDGE, W. Extreme Population-Dependent Linkage Disequilibrium Detected in an Inbreeding Plant Species, *Hordeum vulgare*. **Genetics Society of America, Ohio**, n.172, p. 557-567, 2006.

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

CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J.J.; FUCHS, E.A. Effects of dry tropical Forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology**, Oxford, v. 16, p. 281-289, 2005.

CASTRO, F. de. Invasão dos “clones”. **Agência FAPESP**. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/9711>. Acesso em: 4 jan. 2012.

CAVERS, S.; DEGEN, B.; CARON, H.; LEMES, M.R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A.J. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, London, v. 95, p. 281-289, 2005.

CEPAGRI/UNICAMP. Clima dos Municípios Paulistas (série histórica de 1961-1990). Disponível em: < <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html> >. Acesso em: 15 ago. 2011.

CHAVES, L.J.; VENCOSKY, R.; SILVA, R.S.M.; TELLES, M.P.C.; ZUCCHI, M.I.; COELHO, A.S.G. Estimating inbreeding depression in natural plant populations using quantitative and molecular data. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 12, n. 2, p. 569-576, 2011.

CIAMPI, A.Y.; AZEVEDO, V.C.R.; GAIOTTO, F.A.; RAMOS, A.C.S.; LOVATO, M.B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.8, n.5, p. 1074-1077, 2008.

CINCOTA, R.P.; WISNEWSKI, J.; ENGELMAN, R. Human population in the biodiversity hotspots. **Nature**, Washington, v. 404, p. 990-992, 2000.

CLARK, P.L.; EVANS, F.C. Distance to nearest neighbor as measure of spatial relationship in population. **Ecology**, Washington, v.35, p.445-456, 1954.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lancaster, v. 23, p. 72-84, 1969.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliensis* populations in the brazilian cerrado base don the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, Oxford, n. 12, p. 105-115, 2003.

COLLEVATTI, R.G.; RABELO, S.G.; VIEIRA, R. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae) an endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany**, London, v. 104, p. 655-664, 2009.

CONDIT, R.; ASHTON, P.S.; BAKER, P.; BUNYAVEJCHEWIN, S.; GUNATILLEKE, S.; GUNATILLEKE, N.; HUBBELL, S.P.; FOSTER, R.B.; ITOH, A.; LA FRANKIE, J.V.; LEE, H.S.; LOSOS, E.; MANOKARAN, N.; SUKUMAR, R. E.; YAMAKURA, T. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species, **Science**, Washington, v.288, p.1414-1418, 2000.

CONSERVATION INTERNATIONAL BRASIL. Hotspots Revisitados - As Regiões Biologicamente Mais Ricas e Ameaçadas do Planeta, 16p, 2005. Disponível em: < <http://www.conservation.org.br/publicacoes/index.php?t=2> >. Acesso em: 23 fev 2011.

CORVALAN, L.R.; FERREIRA, A.M.T. Atividade antibacteriana de extratos de *Diospyros hispida* D.C. e *Coupeia gradiflora* Benth. frente a amostras isoladas de úlcera por pressão. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA A UCDB, 10., 2006, Campo Grande. **Caderno de Resumos...** Campo Grande. 2006. p. 34.

COSTA, R.B. **Avaliação do sistema reprodutivo de *Anadenantera falcata* Benth., *Vochysia tucanorum* Mart. e *Xylopia aromatica* Baill. em área de cerrado no município de Itirapina – Estado de São Paulo.** 1988. 93p. Dissertação de Mestrado (Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

COUTINHO, L.M. O bioma do cerrado. p.81. In: Klein, A.L. (Org.) **Eugen Warming e o cerrado brasileiro um século depois.** São Paulo:Ed. UNESP, 2002. p.37

COUTINHO, L.M. Fire in the ecology of the Brazilian Cerrado. In: GOLDAMMER, J.G. **Fire in the Tropical Biota.** Berlim: Springer-Verlag, 1990. p.82-105.

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.

CROSSA, J.; VENCOVSKY, R. Sample size and variance effective population size for genetic resources conservation. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, v.119, p.15-25, 1999.

DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS – Spatial Genetic Software: A computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures for individuals and populations. **Journal of Heredity**, Washington, v. 92, p. 447-448, 2001.

DE OLIVEIRA, P.E.; BARRETO, A.M.F.; SUGUIO, K. Late pleistocene/holocene climatic and vegetational history of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco River. **Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology**, Amsterdam, n. 152, p. 319-337, 1999.

DI RIENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Mutational processes of Simple-Sequence Repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 8, p.3166-3170, 1994.

DICK, C.W.; HARDY, O. J.; JONES, F.A.; PETIT, R.J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, New York, v.1, p. 20-33, 2008.

DI RENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C. VALDEZ, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Mutational processes of simple (Sequence Repeat loci in human populations). **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 8, p. 3166-3170, 1994.

DORKEN M.E.; ECKERT, C.G. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). **Journal of Ecology**, Oxford, v.89, p.339-350, 2001.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, 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.; FRANCO, G.A.D.C.; SIQUEIRA, M.F. A vegetação dos remanescentes de Cerrado no Estado de São Paulo. In: BITENCOURT, M.D.; MENDONÇA, R.R. (Ed.). **Viabilidade da conservação dos remanescentes de Cerrado no Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, 2004. p.29-56.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J.B.; FRANCO, G.A.D.C.; SIQUEIRA, M.F. **Plantas do Cerrado Paulista: imagens de uma paisagem ameaçada**. São Paulo: Páginas & Letras, 2004. v. 1. 475 p.

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

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M.F. de; FRANCO, G.A.D.C. Threats to the Cerrado remnants of the State of São Paulo, Brazil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.64, n.4, p.355-363, 2007.

ECKERT, C.G.; SAMIS, E.; LOUGHEED, C.; Genetic variation across species geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. **Molecular Ecology**, Oxford, n. 17, p. 1170-1188, 2008.

- EISEN, J.A. Mechanistic basis of microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (Ed.) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: University Press, 1999. p. 34-48.
- EITEN, G. Vegetação. In: PINTO, M.N. (Ed.). **Cerrado - Caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: EDUNB., 1994. p.17-74.
- EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S.(Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1990. p. 229-253.
- ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J.M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.1591-1604, 2002.
- ERIKSSON. O. Dynamics of genes in clonal plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.8, p. 313-316, 1993.
- FALEIRO, F.G.; ARAÚJO, I.S.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.F.; YAMADA, M.M.; ANHERT, D. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. **Agrotópica**, Brasília, v. 2, p. 31-34, 2002.
- FELFILI, J.M.; REZENDE, A.V.; SILVA-JÚNIOR, M.C.; SILVA, M.A. Changes in floristic composition of cerrado *sensu stricto* in Brazil over a nine-year period. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.16, p. 579-590, 2000.
- FERES, F.; SOUZA, A.P.; AMARAL, M.C.E.; BITTRICH, V. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de Savanas Neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, p. 277-283, 2005.
- FERREIRA J.R.O. 2002. GPS Trackmaker. Disponível em:<<http://www.gpstm.com>>. Acesso em: 25 jun. 2010.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: CENARGEN-EMBRAPA-Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998. 220p.
- FISCHER, J.; LINDENMAYER, D.B. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 16, p. 265-280, 2007.
- FLINT-GARCIA, S.A.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 357-374, 2003.
- FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.
- FRANKHAM, R. Genetics and extinction (review article). **Biological Conservation**, Beijing, v.126, p.131-140, 2005.

- FRANKHAN, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da conservação**. Tradução de M. R. Francisco; I. P. Farias. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 262p.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DOS ÍNDIOS. 2009. Disponível em: <<http://www.funai.gov.br/>>. Acesso em: 02 ago. 2009.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- GAINO, A.P.S.C.; SILVA, A.M.; MORAES, M.A.; ALVES, P.F.; MORAES, M.L.T.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 1631-1643. 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/970246j837225093/fulltext.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2011.
- GARCÍA-NUÑEZ, C.; AZÓCAR, A.; SILVA, J.F. Seed production and soil seed bank in three evergreen woody species from a neotropical savanna. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, n.17, p.563-576, 2001.
- GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; FERREIRA, A.G. Avaliação da Atividade Alelopática de Extratos Aquosos de Folhas de Espécies de Cerrado. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 174-176, jul. 2007
- GIANNOTTI, E.; LEITÃO FILHO, H.F. Comparação florística do cerrado da Estação Experimental de Itirapina (SP). In: CONGRESSO SOCIEDADE BOTÂNICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 8., 1992, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, v. 21, p.21-25, 1992.
- GOUDET, J. (2001) **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Disponível em: <[www.unil.ch/izea/software/fstat.html](http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html)>. Acesso em: 07 dez. 2011.
- GLAUBITZ, J.C.; MORAN, G. Genetics tools: The use of biochemical and molecular markers. In: YOUNG, A.G; BOSHIER, D.; BOYLE, T.J. (Ed.) **Forest conservation genetics: principles and practice**. Australia: Csiro publishing, 2000. p. 49-53.
- GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.3, n.3, p.369-379, 2004.
- GUSSON, E.; SEBBENN, A.M; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 67, p.123 - 135, 2005.
- HANDEL, S.N. The intrusion clonal growth patterns on plant breeding systems. **The American Naturalist**, Chicago, v. 125, p. 367-384, 1985.

HANSON, T.R.; BRUNFELD, S.J.; FINEGAN, B.; WAITS, L.P. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, n.8, p. 2060-2073, 2008.

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

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDO, E.; BREYNE, P.; CARON, H.; CHEVALLIER, M.H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLE, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n.2, p.559–571, 2006.

HOFFMANN, W.A. Post-burn reproduction of woody plants in a Neotropical savanna: the relative importance of sexual and vegetative reproduction. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, n.35, p.422-433, 1998.

HOFFMANN, W.A.; SOLBRIG, O.T. The role of topkill in the differential response of savanna woody species to fire. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.6172, p.1-14, 2003.

HONNAY, O.; BOSSUYT, B. Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction? **Oikos**, Buenos Aires, n. 108, p.427–432, 2005.

IBAÑES, B.; TARAIZI, R.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Distribuição espacial de uma população de *Diospyros hispida* D.C (EBENACEAE), em uma parcela no cerrado da estação ecológica de Itirapina, Itirapina – SP. **Anais In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO**, 17, 2008. Itirapina. **Anais...** Itirapina, 2008. 50p

IBAÑES, B.; TARAIZI, 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: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 16., 2008. Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2008. 59p.

INSTITUTO BRASILEIRO DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Ecossistemas – Cerrado. Disponível em:<<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 14 Abr. 2009.

INSTITUTO FLORESTAL - IF. Estação Experimental e Ecológica de Assis. Disponível em: <[http://www.iflorestsp.br/dfec/e\\_exp\\_as.htm](http://www.iflorestsp.br/dfec/e_exp_as.htm)>. Acesso em: 14 out. 2009.

INSTITUTO FLORESTAL - IF. **Inventário Florestal da Vegetação Natural do Estado de São Paulo**. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente, 2005. 200p.

ISI WEB OF KNOWLEDGE. Disponível em: <<http://www.isiwebofknowledge.com/>>. Acesso em: 10 out. 2010.

JACQUEMYN, H.; BRYNS, R.; HONNAY, O.; HERMY, M.; ROLDÁN-RUIZ, I. Sexual reproduction, clonal diversity and genetic differentiation in patchily distributed populations of the temperate forest herb *Paris quadrifolia* (Trilliaceae). **Oecologia**, Berlin, n. 147, p. 434-444, 2006.

JAMES, S. Lignotubers and burls - their structure, function and ecological significance in Mediterranean ecosystems, **The Botanical Review**, New York, v.3, n.50, p.225, 1984.

JUDSON, O.P.; NORMARK, B.B. Ancient asexual scandals. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 41-46, 1996.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOSKY, R. Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.64, p. 93-107, 2001.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, p.1099-1106, 2007.

KLINK, C.A.; MACHADO, R. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Gainesville, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

KRONKA, F.J.N.; NALON, M.A.; MATSUKUMA, C.K.; PAVÃO, M.; GUILLAUMON, J. R.; CAVALLI, A.C.; GIANNOTTI, E.; IWANE, M.S.S.; LIMA, L.M.P.R.; MONTES, J.; DEL CALI, I.H.; HAACK, P.G. **Áreas do domínio do cerrado no Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, Instituto Florestal, 1998. 84p.

KRONKA, F.J.N.; NALON, M.A.; MATSUKUMA, C.K.; KANASHIRO, M.M.; YWANE, M.S.S.; PAVÃO, M.; DURIGAN, G.; LIMA, L.M.P.R.; GUILLAUMON, J.R.; BAITELLO, J.B.; BORGIO, S.C.; MANETTI, L.A.; BARRADAS, A.M.F.; FUKUDA, J.C.; SHIDA, C.N.; MONTEIRO, C.H.B.; PONTINHA, A.A.S.; ANDRADE, G.G.; BARBOSA, O.; SOARES, A.P. **Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente; Instituto Florestal; Imprensa Oficial, 2005. 200p.

KUNST, C.; BRAVO, S.; PANIGATTI, J.L. **Fuego en los ecosistemas argentinos**, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Santiago del Estero. p. 259-268, 2003.

LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p.2875-2883, 2003.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.2453-2465, 2002.

LIMA, J.E.F.W.; SILVA, E.M. da. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro. In: SCARIOT, A.; SOUZA-SILVA, J. C.; FELFINI, J. M. (Ed.). **Cerrado:**

Ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. v. 1, p. 61-72.

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.

LIMA-RIBEIRO, M.S. de. Efeitos de borda sobre a vegetação e estruturação populacional em fragmentos de cerrado no sudoeste goiano, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v.22, n.2, p. 535-545, 2008.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 397-401, 1989.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, 1995.

LOPES, R.C. *Ebenaceae* vent. do estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 50, p. 85-107. 1999. Disponível em: [http://rodriguesia.jbrj.gov.br/Rodrig50/85\\_106.pdf](http://rodriguesia.jbrj.gov.br/Rodrig50/85_106.pdf). Acesso em 25 jul. 2009.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. São Paulo:Editora Plantarum, v.1, 1998. p 88.

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

LOVETT DOUST, L. Population dynamics and local specialization in a clonal perennial (*Ranunculus repens*) I. The dynamics of ramets in contrasting habitats. **Journal of Ecology**, Oxford, n. 69, p. 743 – 755, 1981.

LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, Gainesville, v.12, n.1, p.228-237, 1998.

LYNCH, M. A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In: AVISE, J; HAMRICK, J. (Ed.). **Conservation Genetics: Case Histories from Nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. p.471-501.

MACHADO, R.B.; RAMOS NETO M.B.; HARRIS M.B.; LOURIVAL, R.; AGUIAR, L.M.S. Análise de lacunas de proteção da biodiversidade no Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO. FUNDAÇÃO O Boticário de PROTEÇÃO À NATUREZA, 4., 2004. **Anais...** Curitiba, 2004. p. 29-38.

MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e sementes em populações naturais de *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) no Sudeste de Goiás**. 2005. 128p. Tese (Agronomia – Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.



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.

MAX, J. C.M.; MELO, A.C.G.; HONDA, E.A.; DURIGAN, G.; MALÍCIA, L.C.; SOUZA, M.B.M.; CARDOSO, M.M.; BÔAS, O.V.; RAMOS, V.S.; CONTIÉRI, W.A. Plano de Manejo da Floresta Estadual de Assis. **Instituto Florestal**, São Paulo, n. 30, p. 1-80, 2007.

MAYER, C.; SCHIEGG, K.; PASINELLI, G. Patch population structure in a short-distance migrant: evidence from genetic and demographic data. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, p. 2353-2364, 2009.

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.

MEDEIROS, A.C.B.; PEREIRA, R.W.; COLLEVATTI, R.G. Transferibilidade de primers microssatélites de *Tabebuia aurea* para outras espécies do gênero e desenvolvimento de sistema de genotipagem múltipléx. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA/CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE GENÉTICA, 52., 2006. Foz do Iguaçu: **Resumos...** Foz do Iguaçu, 2006.

MEEÛS, T.; BALLOUX F. Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: a simulation study. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam, n. 4, p. 345-351, 2004.

MEIRMANS, P.G.; VAN TIENDEREN, P.H. GENOTYPE AND GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, p.792-794, 2004.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 2008. p.423-442.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado- Programa Cerrado Sustentável**. Brasília, 2006. 56p.

MIRANDA, H.S.; BUSTAMANTE, M.M.C.; MIRANDA, A.C. The Fire Factor. In: OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, R.J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p. 51-68.

MIRANDA-MELO, A.A.; MARTINS, F.R.; SANTOS F.A.M. Estrutura populacional de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. e de *Roupala montana* Aubl. em fragmentos de cerrado no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 501-507, 2007.

MONTORO, G.R.; SANTOS, M.L. dos. Fenologia e biologia reprodutiva de *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae) no Parque Estadual da Serra dos Pireneus, Goiás. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiás, v. 4, n. 1, p. 21-29, 2007.

MORENO, M.A. **Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne) em duas populações no Cerrado do estado de São Paulo**. 2009. 114p. Dissertação de Mestrado (Recursos Florestais – Área de concentração: Conservação de Ecossistemas Tropicais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MOXON, P.A.; WILLIS, C. DNA microsatellites: Agents of evolution? **Scientific American**, New York, n. 280, p. 94-99, 1999.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. DE; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v.403, p.853-858, 2000.

NADER, T.T.; COPPEDE, J.S.; AMARAL, L.A.; FACCHIN, A.L.; PEREIRA, A.M.S.; FERREIRA, L.M. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do Cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n.3, p. 429-433. 2010. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77\\_3/nader.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_3/nader.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2011.

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

OHSAKO, T. Clonal and spatial genetic structure within populations of a coastal plant, *Carex kobomugi* (Cyperaceae). **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 97, n. 3, p. 458 – 470, 2010.

OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetic Research**, Cambridge, v. 33, p.201-204, 1973.

OLIVEIRA, E.O.S. de.; COLLIER, K.F.S.; MOTA, G.M.F. da.; ELY, B.P.; PEREIRA, F. R. Plantas medicinais usadas pela comunidade Kalunga do quilombo do engenho de dentro em Cavalcante – GO para tratamento de afecções bucais. **Revista Cereus**, Gurupi, v. 4, n. 4, 2010. Disponível em <<http://www.ojs.unirg.edu.br/index.php/1/article/viewArticle/51>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

OLIVEIRA, J.E.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

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

PENHA, A.S. **Influência da propagação vegetativa a partir de raízes gemíferas nas características populacionais de espécies arbóreas em fragmentos de florestas estacionais semidecíduais**. 2004. 143p. Tese (Doutor em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

PIELOU, E.C. **An Introduction to Mathematical Ecology**. New York:Wiley, 1969. 286p.

- PINTO, L.R.; VIEIRA, L.M.C.; SOUZA, A.P.; SOUZA JÚNIOR, C.L. Isoenzimas e Microsatélites em Plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 20, p. 16-19, 2001.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNEUT, J.J. BOTTLENECK. A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **The Journal of Heredity**, Cary, v.90, n.4, p.502-503, 1999.
- 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, 2007.
- RAPOSO, A. **Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie**. 2007. 152p. Tese (Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v.60, n.1, p.57-109, 2003.
- REED, D.H. Relationship between population size and fitness. **Conservation Biology**, Oxford, v. 19, p. 563-568, 2005.
- RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. London: Unwin Hyman, 1997. 529p.
- ROSSETTO, M.; GROSS, C.L.; JONES, R.; HUNTER, J. The impact of clonality on an endangered tree (*Elaeocarpus williamsianus*) in a fragmented rainforest. **Biological Conservation**, Essex, n. 117, p. 33-39, 2004.
- SANO, E.E.; ROSA, R.; BRITO J.L.; FERREIRA, L.G. Mapeamento semidetalhado (escala de 1:250.000) da cobertura vegetal antrópica do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 153-156, 2008.
- SANTOS, M.F.; SANO, P.T. EBENACEAE. In: GIULIETTI, A.M. (Org.). **Plantas raras do Brasil**. Ed. UEFS, 2009. p.162.
- SARDAGNA, A.A.; WELTER, I.; BOITEUX, BUSO; G.S.C.; FERREIRA, M.E. Conservação de regiões flangeadoras de locos hipervariáveis do gênero *Capsicum spp* em outros gêneros de Solanaceae. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47., 2001. Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: SBG, 2001.p103.
- SARTORELLI, P.A.R.; SILVA, J.M.S. da.; GORENSTEIN, M.R.; GOMES, J.E.; ÁVILA, E. Q. de. Rebrotas após fogo de espécies arbóreas de diferentes grupos fenológicos foliares em cerrado *stricto sensu*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n. 10, p.1-13, 2007. Disponível em [http://www.revista.inf.br/florestal10/pages/artigos/ARTIGO\\_01.pdf](http://www.revista.inf.br/florestal10/pages/artigos/ARTIGO_01.pdf). Acesso em: 15 dez 2011.

SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.1, p. 1-7, 2005.

SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: Higa, A.R.; Silva, L.(Ed.). **Pomares de sementes de espécies nativas**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná – FUPEF, 2006. p.193-138.

SELKOE, K.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Oxford, n. 9, p. 615-629, 2006.

SILVA, M. C. **Diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética espacial e fluxo gênico em *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore no Cerrado**. 2010. 162p. Tese de Doutorado (Recursos Florestais – Área de concentração: Conservação de Ecossistemas Tropicais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SILVERTOWN, J. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 169, n. 1, p.157–168, 2008.

SILVERTOWN, J.; LOVETT DOUST, J. **Introduction to Plant Population Biology**. London: Blackwell Scientific Publications, 1993. 210p.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity, **Nature**, London, v.163, p.688, 1949.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v.130, p.457-462, 1995.

SORIANO, J.M.; PECCHIOLI, C.; ROMERO, S.; VILANOVA, G.; GIORDANI, E.; BADENES, M. L. Development of microsatellite markers in polyploid persimmon (*Diospyros kaki* Lf) from an enriched genomic library. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 368-370, 2006.

SOULÉ, M. The epistasis cycle: A theory of marginal populations. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 4, p. 165-187, 1973. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2096809>. Acesso em: 20 dez. 2011.

STOECKEL, S.; GRANGE, J.; FERNANDEZ-MANJARREZ, J. F.; BILGER, I.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; MARIETTE, S. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal Forest tree species – *Prunus avium* L. **Molecular Ecology**, Oxford, n. 15, p. 2109-2118, 2006.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, n. 15, p. 199-203, 2000.

SOUZA, R.A.; NESSIM, R.; SANTOS, J.C.; FERNANDES, G.W. Influence of *Apion* sp. (Brentidae, Apioninae) stem-galls on induced resistance and leaf area of *Diospyros hispida* (Ebenaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 50, n.3, p. 433-435, 2006.

SOUZA, L.F. Recursos vegetais usados na medicina tradicional do Cerrado (comunidade de Baús, Acorizal, MT, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 44-54. 2007.

SOUZA, V.C., LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. São Paulo: Editora Plantarum, 2008. 704p.

STENBERG, P.; LUNDMARK, M.; SAURA, A. MLGSIM: a program for detecting clones using a simulation approach. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.3, p.329–331, 2003.

TAI, T. H.; TANSKLEY, S.D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant tissue*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens , v. 8, p.297-303, 1991.

TANNUS, J.L.S.; ASSIS, M.A.; MORELLATO, L.P. C. Fenologia reprodutiva em campo sujo e campo úmido numa área de Cerrado no sudeste do Brasil, Itirapina - S.P. **Biota Neotropica**, São Paulo, n.3, v.6, p. 1-27, 2006.

TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado**. 2009. 139p. Tese de Doutorado (Agronomia – Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, Oxford v. 4, n.6, p. 832-837, 1994.

TOPPA, R. H. **Estrutura e diversidade florísticas das diferentes fisionomias de cerrado e suas correlações com o solo da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP**. 2004. 127p. Tese (Ciências – Área de Concentração: Ecologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

TÓTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, Cold Spring Harbor , n. 10, p. 967-981, 2000.

VALE, V.S.; LOPES, S.F. de. Efeitos do fogo na estrutura populacional de três espécies de cerrado no parque estadual da serra de caldas novas, GO. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007. Caxambu – MG. **Anais...** Caxambu – MG, 2007. p129

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasmas de espécies alógamas. **IPEF**, Piracicaba, n.35, p.79-84, 1987.

VENCOVSKY, R. Análise de Variância de frequências alélicas. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 15, p. 53-60, Suplemento 1, 1992.

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

VIEIRA, F.A. de; CARVALHO, D. de. Maturação e morfometria dos frutos de *miconia albicans* (swartz) Triana (Melastomataceae) em um remanescente de floresta estacional semidecídua montana em Lavras, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1015-1023, 2009.

VITALLI, P. de L. **Análise dos aspectos jurídicos correlatos à zona de amortecimento de unidades de conservação: estudo de caso da Estação Ecológica de Assis, SP**. 2007. 148p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental São Carlos) - Universidade de São Paulo, 2007.

WALLNÖFER, B. The Biology and Systematics of Ebenaceae: a Review. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien**, Austria, p. 485-512, 2001.

WEBER, J.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism, which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal Human Genetic**, Chicago, v. 44, p.388-396, 1989.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

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

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals Eugenics**, New York, v. 15, n. 4, p. 313-354, 1951.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, Lancaster, v. 19, p. 395-420, 1965.

YOUNG, A.G.; BOYLE, T.J. Forest Fragmentation. In: YOUNG, A.G; BOSHIER, D.; BOYLE, T.J.(Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Australia: Csiro publishing, 2000. p. 124.

YOUNG, A.G.; HILL, J.H.; MURRAY, B.G.; PEAKALL, R. Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the sub-alpine forb *Rutidosia leiolepis* F. Muell. (Asteraceae). **Biological Conservation**, Beijing, n.106, p.71-78, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZUCCHI, M.I., BRONDANI, R.P.V., PINHEIRO, J.B., BRONDANI, C. VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.2, p.512-514, 2002.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, n.4, p.449-457, 2003.