Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo

Maria Andréia Moreno

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Recursos Florestais, com opção em Conservação de Ecossistemas Florestais

Piracicaba
2009

Maria Andréia Moreno
Bióloga

Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Recursos Florestais, com opção em Conservação de Ecossistemas Florestais

Piracicaba
2009

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

Moreno, Maria Andréia
Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo / Maria Andréia Moreno. - - Piracicaba, 2009.
115 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Áreas de conservação 2. Árvores florestais 3. Cerrado 4. Leguminosae 5. Variação genética I. Título

CDD 634.973323
M843e

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

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."

Martin Luther King

DEDICO

Ao meu companheiro Selmo.

Aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação. Em especial:

Ao meu bom Deus por atender pela manhã todos os pedidos que fiz à noite!

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama pela orientação, por acompanhar cada parágrafo desta dissertação, pelos ricos ensinamentos, por incentivar sempre o meu crescimento profissional, mas principalmente por ter acreditado em mim desde o início.

Ao amigo Paulo Kageyama, pelo carinho, pelas conversas agradáveis, pelos almoços e jantares divertidos, pelos presentes e chocolates...

Ao pesquisador e amigo Roberto Tarazi, pela paciência, pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho. Sem você eu não teria conseguido! A Monita pela paciência. Obrigada!

À minha família que amo tanto! Meus pais queridos Bráulio e Maria, obrigada por ter me ensinado as quatro lições máximas de vida: fé, humildade, honestidade e força de vontade! E aos meus irmãos queridos: Maurício, Patrícia e Rodrigo, principalmente a minha Pazinha linda! Te voglio bene! Desculpe-me pelos sustos. Zé isso vale pra vc também...obrigada!

Ao meu companheiro Selmo (biólogo por tabela): pela paciência, pelo companheirismo, pelas ausências, pelas lágrimas que você enxugou, pelas caronas, pelas broncas e palavras de incentivo.Obrigada por ficar ao meu lado em todos os momentos! Te amo!

A toda família Leite que sempre me acolheu com tanto amor, obrigada!

Ao Prof. Flávio Gandara minha gratidão pelas preciosas sugestões, auxílio na leitura dos géis, pela amizade e pelo carinho.

À melhor equipe de trabalho do mundo, do laboratório LARGEA do Dep. de Ciências Florestais – Paulo, Flávio, Dani Talora, Roberto, Pedro, Guilherme, Carol (Força amiga!), João Cobrão, Sybelle, Lia, Renata e Moira, em especialmente às minhas irmãs de coração: Elza, Gabí, Bruna, Lais, Giulia e Rebeca pelo espírito de equipe, pela união, pelo aconchego, pelas risadas e lágrimas, pela força! À Cristina Defavari pelo carinho e amizade.

A todos que me auxiliaram nas coletas de campo: Elza, Gabí, Guilherme, Roberto, Carol e Francisco (Oi moça!).

À Maria Carolina Silva, minha amiga Carol (Força amiga!), pela grande ajuda na etapa final da minha dissertação. Obrigada!

Aos amigos queridos: Karina Martins, Tânia Maria de Moura, João Dagoberto dos Santos, Roberto Tarazi, Sybelle Barreira, Graciela Sobierajski, Profa. Maria Imaculada Zucchi e Prof. Mário Moraes pelas valiosas dicas e sugestões.

A todos os eternos amigos da UNIMEP, em especial a Joze, João, Juliano, Rubens e Nathalia, Lí, Danice e Carlinha!

A toda família Ferraz, principalmente a Elza por várias coisas: pelas ausências no LARGEA, pelas caronas, pelos bolos, pela amizade, pelo apoio em todos os momentos.

À amiga Tereza Garcia obrigada pelos ensinamentos de vida! Santa Tereza!

Aos funcionários e Docentes do Departamento de Ciências Florestais, em especial à Margarete (Lindinha), Catarina (Xuxinha), Zé Martins, Eliezer, Alba, Daieli, Prof. Fernando Seixas e Prof. José Leonardo de Moraes Gonçalves pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do IPEF, principalmente ao Evandro, Rogério, Marialice e Paulinho.

Aos amigos do PPG em Recursos Florestais: Shirley (paçoquinha), Joyce (Força amiga!), ao casal Maria Carolina e Felipe, Andreza e Jedi.

Ao Prof. Vinícius de Castro da ESALQ/USP pelo auxílio na identificação da espécie.

Aos Professores Jorge Tamashiro e João Aranha Filho do IB da UNICAMP por permitir o acesso à última revisão bibliográfica do gênero.

À Doutora Ana Ciampi por ter gentilmente cedido as seqüências dos *primers* para transferência e permitir a publicação destas.

À Profa. Beatriz Appezzato-Da-Glória pelo interesse no meu trabalho, pelo material bibliográfico, pelas dicas e pelas lindas imagens subterrâneas do jatobá-do-cerrado.

Ao pesquisador Paulo Ernani Ramalho Carvalho da EMBRAPA Florestas por ter gentilmente cedido o mapa de distribuição do jatobá-do-cerrado.

Ao Instituto Florestal, pela permissão de coletas na EE de Itirapina e EE de Assis, em especial aos funcionários Gilson e Edivaldo Furlan pelo auxílio nos trabalhos de campo.

À Profa. Anete Pereira de Souza (UNICAMP), pela oportunidade de participar do curso de microssatélites e principalmente ao monitor e amigo Thiago Marconi pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai e ao funcionário Elias, do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do CENA/USP pela contribuição neste trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 10
1 INTRODUÇÃO 11
1.1 Objetivos 13
1.2 Hipóteses 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14
2.1 O Cerrado 14
2.2 O gênero *Hymenaea* Linnaeus 18
2.3 Importância econômica do gênero *Hymenaea* Linnaeus 21
2.4 *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne 21
2.5 Importância econômica de *H. stigonocarpa* 26
2.6 Diversidade genética em populações naturais 27
2.7 Estrutura genética 30
2.8 Fluxo gênico 31
2.9 Estrutura genética de populações de plantas clonais 33
2.10 Genética da conservação 35
2.11 Marcadores microssatélites 37
2.12 Marcadores cloroplastidiais 40
3 MATERIAL E MÉTODOS 43
3.1 Áreas de estudo e amostragem 43
3.1.1 Estação Ecológica de Itirapina 44
3.1.2 Estação Ecológica de Assis e Floresta Estadual de Assis 46
3.2 Coleta de sementes e produção de mudas 47
3.3 Procedimentos laboratoriais 49
3.3.1 Extração e quantificação do DNA 49
3.3.2 Amplificação dos locos microssatélites 51
4 ANÁLISE DOS DADOS 52
4.1 Aspectos demográficos 52
4.2 Caracterização da diversidade genética 53

4.2.1 Descriminação de clones e diversidade clonal 53
4.2.2 Diversidade genética e parâmetros afins 54
4.2.3 Diversidade haplotípica 55
4.2.4 Detecção de gargalos genéticos 55
4.2.5 Estrutura genética espacial 56
4.2.6 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund 56
4.2.7 Tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação 57
4.2.8 Fluxo gênico contemporâneo 58
4.2.9 Estrutura genética entre populações e fluxo gênico realizado 58
5 RESULTADOS 60
5.1 Aspectos demográficos 60
5.2 Transfereabilidade e amplificação dos locos microssatélites nucleares 62
5.3 Transfereabilidade e amplificação dos locos microssatélites cloroplastidiais 65
5.4 Caracterização dos locos microssatélites nucleares transferidos 67
5.5 Diversidade e heterogeneidade clonal 74
5.6 Detecção de gargalos genéticos 75
5.7 Estrutura genética espacial 79
5.8 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund 80
5.9 Tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação 80
5.10 Fluxo gênico contemporâneo 82
5.11 Fluxo gênico realizado 83
5.12 Diversidade de marcadores cloroplastidiais 83
6 DISCUSSÃO 86
6.1 Aspectos demográficos 86
6.2 Transferibilidade dos locos microssatélites e propagação vegetativa 89
6.3 Diversidade genética, estrutura genética espacial e parâmetros afins 91
6.4 Fluxo gênico contemporâneo via pólen 94
6.5 Implicações para conservação 95
7 CONCLUSÕES 96
REFERÊNCIAS 97

RESUMO

Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura populacional e genética de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne em duas áreas no Cerrado do Estado de São Paulo. Para tanto, foram transferidos oito iniciadores microssatélites nucleares (SSR) de *Hymenaea courbaril* para *H. stigonocarpa*, além de cinco iniciadores microssatélites cloroplastidiais (cpSSR) universais. O presente trabalho respondeu às hipóteses sobre a dispersão restrita de sementes, a existência de propagação vegetativa e a viabilidade evolutiva das populações nas unidades de conservação analisadas. O estudo foi conduzido em duas unidades de conservação administradas pelo Instituto Florestal do Estado de São Paulo e representam alguns dos últimos remanescentes protegidos de Cerrado no Estado, com fisionomias e históricos contrastantes. Na população localizada na Estação Ecológica de Itirapina (EEI), Itirapina, S.P., foram encontrados 68 indivíduos de *H. stigonocarpa* dispostos em reboleiras. Utilizando marcadores SSR, foram constatados apenas 18 genótipos diferentes (genetes), evidenciando a propagação vegetativa na EEI. Apesar do número reduzido de genetes na área, esta população apresentou excesso de heterozigotos. Mesmo assim, a área mínima viável para conservação (AMV) foi maior do que a área total da EEI devido à baixa densidade de indivíduos. A análise de paternidade, utilizando todas as sementes disponíveis na EEI (n = 71), revelou que 42,46% tiveram doadores de pólen fora na área amostrada e o tamanho efetivo de vizinhança de polinização foi de 1.283 ha, mostrando a importância da preservação de áreas particulares ou a expansão da unidade de conservação. Houve dominância de doadores de pólen e a distância média de polinização foi de 2.325 m, variando de 0,35 a 3.570 m. Além disso, os marcadores cpSSR revelaram um forte efeito fundador, com a existência de um único haplótipo. Contrastando com a EEI, a população estudada na Estação Ecológica de Assis e na Floresta Estadual de Assis (EEA) apresentou 47 indivíduos distintos geneticamente (genetes). O uso de marcadores SSR na população da EEA revelou um alto e significativo índice de fixação ($\hat{f}$ = 0,177), associado a uma significativa estrutura genética espacial (EGE) ($\hat{\theta}_{xy}$ = 0,075) até 750 m. A EGE foi resultante de uma dispersão restrita de sementes, comprovada pelo uso de marcadores cpSSR. A alta divergência genética demonstrada pelos marcadores SSR e o número de haplótipos privados encontrado na população da EEA fez com que cada população fosse considerada uma Unidade Independente para o Manejo (UIM) e, ao mesmo tempo uma Unidade Evolutiva Significativa (USE). Essas designações implicam que, apesar das populações da EEA e da EEI possuírem um tamanho efetivo (N_e) e uma AMV insuficientes para a manutenção da endogamia local de *H. stigonocarpa* em curto prazo, a localização específica dessas unidades permitiu englobar reservatórios gênicos distintos, importantes para se iniciar uma conservação evolutivo-adaptativa. Assim, programas visando a restauração florestal ou melhoramento de *H. stigonocarpa* devem contemplar genótipos de cada USE. Além disso, a coleta de sementes visando a conservação deve obedecer a uma distância mínima de 750 m quando os indivíduos não estiverem dispostos em reboleiras.

Palavras-chave: *Hymenaea stigonocarpa*; Cerrado; Genética; Propagação vegetativa; Conservação

ABSTRACT

Genetic structure and clonal diversity of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) in two populations of the Cerrado in the State of São Paulo

This study aimed to evaluate the population and genetic structure of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne in two areas of Cerrado in the State of São Paulo. For this, eight nuclear microsatellite (SSR) primers from *Hymenaea courbaril* and five universal chloroplastidial microsatellite primers (cpSSR) were transferred from *Hymenaea coubaril* to *H. stigonocarpa*. This study answered the assumptions regarding restricted seed dispersal, vegetative propagation and the existence of the populations' evolutionary viability in the studied conservation units. This study was conducted in two protected areas managed by the Forest Institute State of São Paulo and represent some of the last protected remnants of Cerrado in the State with contrasting physiognomies and history. The 68 trees of *H. stigonocarpa* on the population located in the Ecological Station of Itirapina (ESI), Itirapina, S.P., were spatially clumped. Using SSR markers only 18 different genotypes (genets) were found, showing the existence of vegetative propagation in ESI. Despite the limited number of genets in the area, this population showed an excess of heterozygotes. Even so, the minimum viable area for conservation (AMV) was greater than the total area of the ESI due to low density of individuals. The paternity analysis using all the available seeds in ESI (n = 71) revealed that 42.46% of pollen donors were outside the sampled area and the effective neighborhood size of pollination was 1283 ha demonstrating the importance of surrounding areas and the expansion of the protected area. There was pollen donor dominance and the average distance of pollination was 2325 m, ranging from 0.35 to 3570 m. Furthermore, the markers cpSSR revealed a strong founder effect, with the existence of a single haplotype. In contrast to the ESI, the population studied in the Ecological Station of Assis and in the Assis State Forest (EEA), had 47 trees, all genets. The use of SSR markers in the population of the ESA revealed a high and significant fixation index ($\hat{f}$ = 0177), associated with a significant spatial genetic structure (SGS) ($\hat{\theta}_{xy}$ = 0075) up to 750 m. The SGS was originated by a limited seed dispersal, as evidenced by the use of cpSSR markers. The high genetic divergence shown by SSR markers and the number of private haplotypes found in the population of the ESA are reasons to consider each population independent units for management (IUM) and at the same time an Evolutionary Significant Unit (ESU). These designations mean that, in despite of the populations of the ESI and ESA have insufficient effective sizes (N_e) and AMV for the maintenance of *H. stigonocarpa* inbreeding level in the short term, the specific location of these units allowed to include different gene pools, important in starting an adaptive-evolutionary conservation. Thus, programs aimed at forest restoration or breeding of *H. stigonocarpa* shall address each ESU genotypes. Moreover, the collection of seeds for conservation should have a minimum distance of 750 m among trees, when these are not clumped.

Keywords: *Hymenaea stigonocarpa*; Cerrado; Genetics; Vegetative propagation; Conservation

1 INTRODUÇÃO

Considerado o segundo maior Bioma brasileiro, o Cerrado ocupa cerca de 2 milhões de km^2, ou cerca de 24% do território nacional, sendo superado em área apenas pela Amazônia (MMA, 2006). A biodiversidade total do Cerrado foi estimada em cerca de 160.000 espécies de plantas, animais e fungos. O Cerrado possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo (KLINK; MACHADO, 2005) com uma marcante heterogeneidade florística em sua ampla área de distribuição e um elevado nível de endemismo, com 44% das espécies de plantas vasculares endêmicas (MYERS et al., 2000). Mendonça et al. (2008) elaboraram uma revisão florística e descrevem 13.171 táxons e 12.356 espécies que ocorrem espontaneamente no Cerrado, sendo que somente a flora vascular nativa engloba 11.627 espécies.

A riqueza de espécies do Cerrado, tanto para a produção de alimentos como para medicinais fitoterápicos e óleos essenciais, vem sendo utilizada por comunidades que usam e protegem este Bioma, apontando importantes alternativas para o uso sustentável do mesmo. Esse cabedal de conhecimento tradicional, aliado aos conhecimentos básicos de ecologia e genética das espécies, pode ajudar a encontrar caminhos de uso e conservação do Cerrado, justamente porque este Bioma tem sido um dos mais rapidamente destruídos no Brasil nas últimas décadas, cedendo lugar para extensas monoculturas, principalmente de soja, ou para pastagens (SILVA; BATES, 2002; DURIGAN, 2003; KLINK; MACHADO, 2005; SILVA et al., 2006).

Dados do MMA (2006) indicam que a área do Cerrado recoberta por vegetação nativa em suas diversas fitofisionomias, considerando-se o ano base 2002, representa 60,42% do Bioma. Destes, apenas 3,18% ou 6.233.193,73 ha do Bioma estão protegidos e distribuídos entre 48 unidades de conservação federais, estaduais e municipais (MMA, 2006). Segundo Machado et al. (2004) pelo menos 20% das espécies endêmicas e ameaçadas permanecem fora dos parques e reservas existentes. Estes autores ressaltam ainda que o desmatamento do Bioma no Brasil chega a 1,5% ou 3 milhões de ha/ano. Desta forma, o Cerrado está sendo destruído com uma velocidade superior à capacidade de regeneração natural e ao conhecimento gerado para sua proteção e conservação (AGUIAR; MACHADO; MARINHO-FILHO, 2004). No Estado de São Paulo, manchas desta vegetação correspondiam a cerca de 3,5 milhões de ha de vegetação natural, cerca de 14% do estado (KRONKA et al., 1998). Hoje, o Cerrado ocorre sob a forma de fragmentos isolados totalizando 210.000 ha, o que corresponde a 0,85% da superfície estadual. (KRONKA et al., 2005).

O desmatamento e o avanço das fronteiras agrícolas têm alterado a dinâmica populacional de muitas espécies do Cerrado (DURIGAN, 2003). 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 e à redução da adaptabilidade da espécie a mudanças, principalmente as climáticas, ameaçando as espécies presentes neste habitat. (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999; COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001; VENCOVSKY, 1987; ZUCCHI et al., 2003). Existe uma concordância geral de que as reservas e os parques florestais tropicais devem ser estabelecidos e manejados de maneira a preservar a máxima variabilidade genética dentro das espécies (WHITMORE, 1980). O conhecimento da estrutura genética, isto é, da forma como a variabilidade genética se distribui entre e dentro das populações de uma espécie, permite determinar a viabilidade evolutiva das populações ao longo das gerações, estimar a área mínima viável para conservação e a intensidade ideal de coleta de sementes e distância mínima de coleta entre matrizes para fins de conservação genética *in situ* e *ex situ*, ou ainda, de melhoramento genético (EPPERSON, 1990). Estes conhecimentos têm sido beneficiados pelo emprego de marcadores genéticos, principalmente os codominantes, como as isoenzimas e os microssatélites (SSR- *Simple Sequence Repeat*) (ALVES et al., 2003; GRATTAPAGLIA, 2004). Porém, sem dados sobre a estrutura genética, decisões sobre os meios mais efetivos para preservação e uso sustentável do Cerrado não podem ser tomadas.

Nesse contexto, torna-se imprescindível gerar informações relacionadas com variabilidade genética dos poucos núcleos restantes do Cerrado, principalmente no Estado de São Paulo. Para isso, a escolha de espécies-chaves, o conhecimento da biologia da espécie, da dinâmica e estrutura das populações são fatores importantes para que se promova uma conservação genética efetiva, proporcionando à espécie e ao ecossistema a expressão de seu potencial evolutivo.

Buscando atender aos critérios de seleção de espécies prioritárias para a conservação genética proposto por NAMKOONG (2000), a espécie *Hymenaea stigonocarpa* foi selecionada como espécie-alvo para a realização deste estudo. *H. stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado) é uma Leguminosae (Caesalpinoideae) de ampla distribuição e ocorrência em formações abertas do cerrado e campo-cerrado (ALMEIDA et al., 1998), sendo uma espécie lenhosa endêmica deste bioma e que apresenta múltiplos usos (CARVALHO, 2007).

1.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver estudos genéticos com *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne em duas áreas no Cerrado do Estado de São Paulo, avaliando sua estrutura populacional e genética. De forma mais específica os objetivos foram:

a) Testar a amplificação de iniciadores de microssatélites desenvolvidos para *Hymenaea courbaril* em *Hymenaea stigonocarpa*, uma vez que ainda não foram desenvolvidos iniciadores específicos para a espécie em estudo;
b) Testar a amplificação de iniciadores microssatélites cloroplastidiais, considerados universais por terem sido utilizados com sucesso em diversas espécies;
c) Caracterizar a diversidade genética intra e interpopulacional por marcadores microssatélites;
d) Estudar a estrutura genética espacial intrapopulacional;
e) Estimar o fluxo gênico aparente e a contribuição relativa da migração de pólen e sementes;
f) Caracterizar o sistema de reprodução para uma população da espécie;
g) Com base em indicadores genéticos, propor recomendações para estratégias de conservação *in situ* e para coleta de sementes nas populações estudadas.

1.2 Hipóteses

O presente estudo teve como base as seguintes hipóteses:

a) A espécie considerada predominantemente alógama, com dispersão via pólen realizada por morcegos, deve apresentar elevada diversidade genética, porém, também deve apresentar uma elevada endogamia associada à estrutura genética espacial dentro das populações, devido à dispersão de sementes espacialmente restrita e à propagação vegetativa;

b) Devido a um fluxo gênico restrito via sementes e a grande distância geográfica entre as duas populações, a divergência genética entre elas deve ser alta e cada população deve ser considerada uma Unidade Independente para o Manejo (UIM) e uma Unidade Evolutiva Significativa (USE).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Cerrado

Considerado o segundo maior Bioma brasileiro, o Cerrado ocupa cerca de 2 milhões de km^2 ou, 24% do território nacional e apresenta uma área nuclear distribuída principalmente pelo Planalto Central Brasileiro, nos Estados de Goiás, Tocantins, a região sul de 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 (IBAMA, 2008). As interfaces com outros Biomas são particularmente importantes no Cerrado, pois estes limitam-se com todos os demais Biomas de terras baixas da América do Sul, ressaltando-se os ambientes contrastantes como as interfaces entre Cerrado e Caatinga e aquelas entre Cerrado e Florestas Tropicais úmidas (FELFILI; SCARIOT; SILVA et al., 2005).

O clima do Cerrado é predominantemente tropical estacional com um regime de chuvas no verão, com intensidades intermediárias entre as regiões mais secas do Nordeste e as mais úmidas do Sudeste e do Norte brasileiros. A precipitação anual varia entre 750 e 2000 mm, com uma média de 1500 mm. Em média esse número não é muito inferior à quantidade de chuvas que caem na Região Amazônica (de 1500 a 3500 mm/ano) ou na Floresta Atlântica (de 2000 a 2500 mm/ano), o que difere é que nestas duas regiões as chuvas são mais bem distribuídas ao longo do ano (BIZERRIL, 2004). As temperaturas médias são de 22ºC para a porção Sul e de 27ºC para a porção Norte.

No geral, o Cerrado encontra-se sobre um relevo suave, com menos de 300 m, mas apresenta chapadas com até 2030 m (RIBEIRO; SILVA, 1996). Os solos são bem drenados, profundos e na sua maioria distróficos, ou seja, são ácidos, ricos em ferro e alumínio e de baixa fertilidade (KLINK; MACHADO, 2005). Do ponto de vista hidrológico o Cerrado participa das três maiores bacias hidrográficas Sul-americanas (Tocantins-Araguaia, São Francisco e Paraná). Por conter zonas de planalto, a região possui diversas nascentes de rios e, conseqüentemente, importantes áreas de recarga hídrica, que contribuem para grande parte das bacias hidrográficas brasileiras (LIMA; SILVA, 2005). Também pelos diversos aqüíferos nele localizados, entre eles o aqüífero Guarani, considerado um dos maiores reservatórios de águas subterrâneas do mundo, com um volume aproveitável de água da ordem de 40 km^3/ano (BIZERRIL, 2004), o Cerrado é

fundamental para a manutenção do equilíbrio hidrológico do país, contribuindo com 14% do total da produção hídrica superficial brasileira (LIMA; SILVA, 2005).

De acordo com Coutinho (1978), há desde fisionomias predominantemente campestres, como campo limpo, passando por formações savânicas, como campo sujo, campo cerrado e cerrado *sensu stricto* (em ordem crescente de biomassa lenhosa), e florestais (cerradão). O cerrado *sensu stricto* (s.s.) ou sentido restrito, que ocupa aproximadamente 70% do Bioma, tem paisagem composta por um estrato herbáceo dominado principalmente por gramíneas e um estrato de árvores e arbustos variando em cobertura de 10 a 60 % (EITEN, 1972). Segundo Eiten (1994), as formas fisionômicas do Cerrado dependeriam de três aspectos do substrato: a fertilidade e o teor de alumínio disponível (baixa fertilidade, altos teores de alumínio), a profundidade do solo e o grau de saturação hídrica das camadas superficial e subsuperficial do solo.

Considerada uma das 25 regiões prioritárias para o estudo e conservação da biodiversidade no mundo (MYERS et al., 2000), o Cerrado possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo (KLINK; MACHADO, 2005) com 44% de plantas vasculares endêmicas (MYERS et al., 2000). Mendonça et al. (2008) elaboraram uma revisão florística e descrevem 13.171 táxons e 12.356 espécies que ocorrem espontaneamente no Cerrado, sendo que somente a flora vascular nativa engloba 11.627 espécies, e a família mais representativa é Leguminosaea (Fabaceae, Mimosaceae, Caesalpiniaceae) com 108 gêneros e 1.174 espécies. Esses resultados praticamente dobram o número de espécies descritas por Mendonça et al. (1998), de 7.000 espécies vasculares, e Coutinho (2000), de 3.000 espécies.

Roel e Arruda (2003) afirmam que o Cerrado apresenta grande potencial como fonte de recursos naturais nos setores madeireiro, combustível, ornamental, forrageiro, alimentício e farmacêutico. A riqueza de espécies medicinais, por exemplo, supera em muito a relatada por Dias (1996), que estimou haver mais de 100 espécies medicinais em todo o Bioma. Vieira e Martins (2000), em uma revisão sobre plantas medicinais do Cerrado, compilaram 82 famílias botânicas contendo 270 espécies com indicação medicinal. Guarim Neto e Morais (2003) adicionaram mais 291 espécies não relatadas por esses autores, o que faz com que o número estimado de espécies vegetais medicinais do Cerrado, até o presente, se eleve para 561.

Ao lado da riqueza natural, o Cerrado abriga uma ampla diversidade cultural e social, representado em cerca de 1500 municípios (MMA, 2006), cuja história remonta há no mínimo 11

mil anos com os povos caçadores e coletores que se aproveitavam da diversidade de ecossistemas e espécies úteis que o Cerrado oferecia (TELLES, 2007). Algumas comunidades indígenas ainda hoje podem ser localizadas distribuídas pelo Bioma, contribuindo para enriquecer a vida no Cerrado, a exemplo os Xavantes, Krahôs, remanescentes de quilombos e os Kalungas da Chapada dos Veadeiros (TELLES, 2007).

Apesar da diversidade biológica e cultural que o Cerrado propicia, este Bioma tem sido um dos mais rapidamente destruídos no Brasil nas últimas décadas, cedendo lugar para extensas monoculturas, principalmente de soja, ou para pastagens (SILVA; BATES, 2002; DURIGAN, 2003; KLINK; MACHADO, 2005; SILVA et al., 2006). Aspectos como facilidade de mecanização (áreas planas e/ou suavemente onduladas); correção dos solos; possibilidade de irrigação; proximidades de centros consumidores e exportadores; redes viárias, de extensão, de pesquisa e de comercialização; menor complexidade do ecossistema, se comparado com o amazônico; e sem riscos de salinização como boa parte do semi-árido brasileiro, aponta para a região do Cerrado como uma das de maior potencial agrícola do país. (KER; RESENDE, 1996). De acordo com Klink e Moreira (2002), 40% da produção nacional de soja e 22% da produção nacional de milho, são provenientes da região nuclear do Cerrado.

Esta região também abriga 44% do rebanho bovino nacional, responsável por 55% da produção de carne do país (MACEDO; KICHEL; ZIMMER, 2000). As práticas agrícolas no Cerrado incluem o uso extensivo de fertilizantes e calcário (MÜLLER, 2003), os quais poluem córregos e rios. Além disto, o amplo uso de gramíneas africanas para a formação de pastagens é prejudicial à biodiversidade, aos ciclos de queimadas e à capacidade produtiva dos ecossistemas (KLINK; MOREIRA, 2002; SILVA, 2005). Atualmente as pastagens plantadas com gramíneas de origem africana cobrem uma área de 500.000 km² enquanto a área total para conservação é de cerca de 33.000 km², claramente insuficiente quando comparada com os principais usos da terra no Cerrado (KLINK; MACHADO, 2005).

A ocupação humana e a construção de estradas fizeram com que uma massa contínua de área com biota natural se transformasse numa paisagem cada vez mais fragmentada, composta por ilhas inseridas numa matriz agrícola (MMA, 2002). Levantamentos obtidos no âmbito da iniciativa PROBIO (MMA/CNPq/BIRD/GEF), indicam que em pouco mais de quatro décadas, 26% do território compreendido pelo Bioma Cerrado foram transformados em áreas de pastagem cultivada e 10% em agricultura (SANO et al., 2008). Dados do MMA (2006) indicam que a área

do Cerrado recoberta por vegetação nativa em suas diversas fitofisionomias, considerando-se o ano base 2002, representa 60,42% do Bioma. A área de vegetação nativa florestal, somadas às diversas fitofisionomias nessa categoria, abrange 36,73% do Bioma, enquanto a área de vegetação nativa não-florestal recobre 23,68% deste. O restante refere-se aos 38,98% de área antrópica, onde a categoria predominante é a de pastagens cultivadas (26,45% do Bioma), e a 0,6% de água (Figura 1).

Atualmente apenas 3,18% ou 6.233.193,73 ha do Cerrado estão protegidos e distribuídos entre 48 unidades de conservação federais, estaduais e municipais (MMA, 2006). Segundo Machado et al. (2004), cerca de pelo menos 20% das espécies endêmicas e ameaçadas permanecem fora dos parques e reservas existentes.

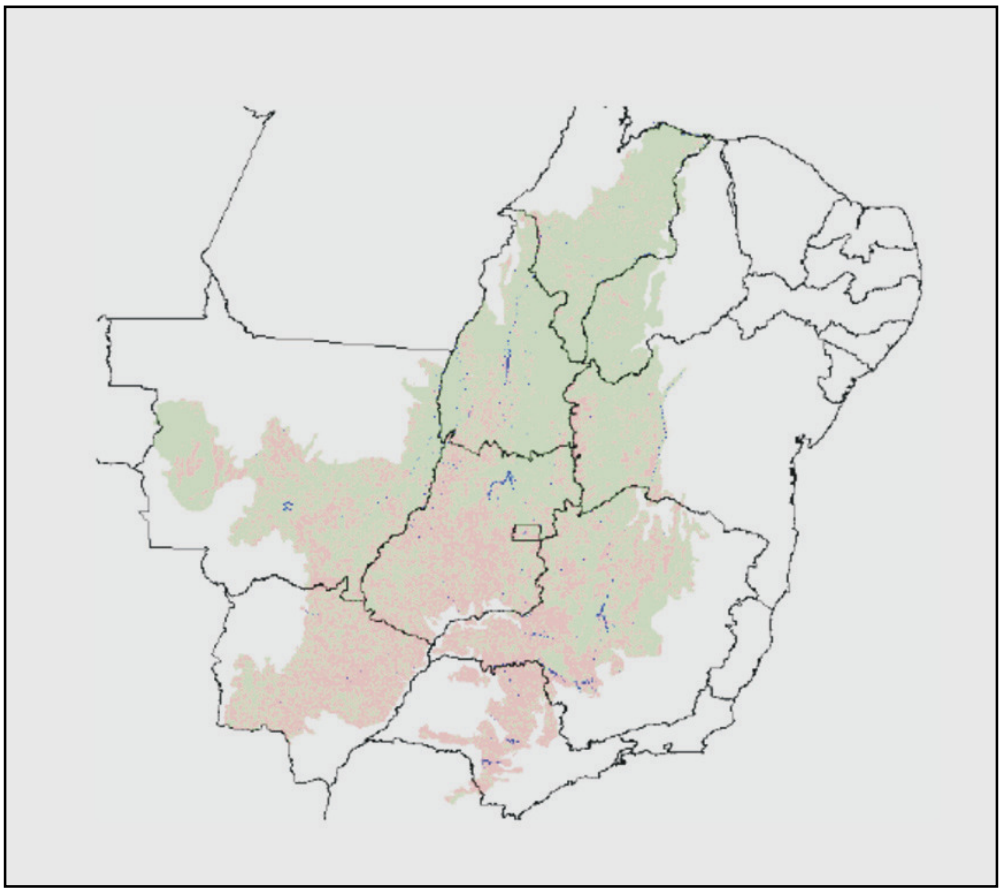

Figura 1 - Distribuição espacial de áreas com vegetação nativa (verde), áreas antrópicas (rosa) e massas d'água (azul) no Bioma Cerrado, ano base 2002 (MMA, 2006)

Localizado no limite sul da extensa região de domínio do Cerrado, o Estado de São Paulo continha, no início do século XX, manchas desta vegetação que correspondiam a cerca de 3,5 milhões de ha de vegetação natural, cerca de 14% do estado (KRONKA et al., 1998), dispersas em uma paisagem predominantemente florestal. Entre 1962 e 1992 houve uma redução de 87% desta área (KRONKA et al., 1998). Hoje ocorre sob a forma de fragmentos isolados totalizando 210.000 ha, o que corresponde a 0,85% da superfície estadual. (KRONKA et al., 2005).

DURIGAN; SIQUEIRA; FRANCO (2007) estudaram o entorno de 81 fragmentos de Cerrado no Estado de São Paulo analisando os tipos de perturbação que ocorrem no ecossistema e os resultados apontaram como ameaças mais freqüentes: gramíneas invasoras (35% das áreas parcial ou totalmente invadidas), presença de gado (32%), desmatamento (21%) e fogo (21%). A principal diferença do Estado de São Paulo, em relação ao cenário nacional de destruição do Bioma, tem sido que os plantios de cana são os principais substitutos das áreas de Cerrado (KRONKA et al., 2005; DURIGAN; FRANCO; SIQUEIRA, 2004), enquanto em outros estados do núcleo do Cerrado a soja tem sido recentemente a principal causa do desmatamento, seguida pelo milho.

Diversos estudos relacionados com a conservação genética de espécies do Cerrado vêm apontando que as alterações provocadas por atividades antrópicas nas últimas quatro décadas possivelmente causaram a redução da variabilidade genética das espécies por deriva genética, a restrição do fluxo gênico e conseqüentemente aumentaram a endogamia, o podem conduzir à fixação de alelos deletérios, e a redução da adaptabilidade das espécies a efeitos estocásticos, ameaçando as espécies presentes neste habitat (COLLEVATTI; BRONDANI ; GRATTAPAGLIA, 1999; COLLEVATTI ; GRATTAPAGLIA ; HAY, 2001; VENCOVSKY, 1987; ZUCCHI et al., 2003).

2.2 O gênero *Hymenaea* Linnaeus

O gênero *Hymenaea* Linnaeus pertence às Fabaceae da subfamília das Caesalpinioideae que representa um dos grupos mais importantes na produção de resinas e têm presença destacada em ecossistemas equatoriais da África e América do Sul (LEE; LANGENHEIM, 1975).

Ceratia foi o primeiro nome dado ao gênero *Hymenaea* descrito por Bauhin em 1623; duas décadas mais tarde, Piso (1642) e Marcgraf (1648), *apud* LEE e LANGENHEIM (1975),

descreveram o gênero com o nome de *Jetaíba*. Meio século depois, ainda, Plumier (1703), *apud* LEE e LANGENHEIM (1975), escolheu o nome *Courbaril* para esse gênero. Apenas em 1737, Linnaeus, ao se referir ao mesmo gênero, escolheu o nome *Hymenaea*, referência ao deus grego do casamento, Himeneu, fazendo alusão aos dois folíolos pareados das folhas. Linnaeus também viria a descrever a brasileira *H. courbaril* (LEE; LANGENHEIM, 1975). Muitas outras espécies desse gênero seriam descritas mais tarde por outros botânicos; por exemplo, Hayne, Bentham, Huber, Ducke e Lee e Langenheim.

A mais recente revisão de gênero foi feita por Lee e Langenheim (1975) com 14 espécies que compõem o gênero, sendo que cinco delas se dividem em 12 variedades. Em sua maioria, essas espécies ocupam áreas neotropicais. Treze dentre essas 14 espécies encontram-se distribuídas pela América Central, América do Sul, oeste das Índias e uma espécie de ocorrência no Leste da África, a espécie *Hymenaea verrucosa* Gaertner (LEE; LANGENHEIM, 1975). Segundo esses autores o centro de origem do gênero foi na África, enquanto o centro de diversidade foi a região amazônica.

O número cromossômico diplóide é de 24 para todas as espécies desse gênero, sendo que não há evidência de hibridização ou poliploidia. Tal uniformidade é coerente com o padrão geral das leguminosas arbóreas tropicais e nem sempre fica restrita a espécies de um mesmo gênero, sendo também comum em nível de tribo (LEE; LANGENHEIM, 1975), de tal modo que o número cromossômico é de pouco valor taxonômico na distinção de espécies. A principal dificuldade na delimitação da taxa se deve à grande variedade morfológica observada para esse gênero.

No Brasil, as espécies mais freqüentes são *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, que ocorre na Caatinga e no Cerrado e *Hymenaea courbaril* L. que pode ser encontrada desde a floresta amazônica até a floresta estacional semidecidual no sudeste do país, sob a forma de diferentes variedades (CASTELENN, 2005). Há uma grande plasticidade fenotípica dentro do gênero, algumas espécies desenvolvem menos de três metros de altura (*H. stigonocarpa*), enquanto outras desenvolvem mais de 40 metros, como a *H. courbaril* var. *altissima* Ducke, encontrada na Mata Atlântica. Há também uma grande variação de densidade de indivíduos para esse gênero, conforme o tipo de ecossistema (LEWINSOHN, 1980).

As flores quiropterófilas de Caesalpinioideaea são relativamente pequenas e pouco especializadas, estando as do gênero *Hymenaea* L. dentre as mais simples de todas as flores

quiropterófilas conhecidas (ARROYO, 1981). As flores são sempre brancas, com exceção da espécie rara *Hymenaea rubriflora* Ducke, que apresenta coloração vermelha. As flores apresentam quatro sépalas, cinco pétalas, dez estames e um pistilo; as inflorescências são do tipo panículo curto (e corimbosa, quando madura) (LEE; LANGENHEIM, 1975). As flores quiropterófilas do gênero *Hymenaea* L. também são polinizadas por mariposas. Contudo, o néctar produzido leva à polinização com vôos de flor em flor ("trapline syndrome"), favorecendo a polinização cruzada (LEE; LANGENHEIM, 1975). Crestana e Mariano (1985) estudaram a espécie *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* e identificaram além de morcegos, a visita de beija-flores, himenópteros e dípteros.

A floração ocorre durante a estação seca ou na transição para a estação chuvosa. Porém, o período de floração pode variar bastante, uma vez que as espécies podem ocupar regiões bastante diversas. A espécie *H. stigonocarpa*, assim como várias outras desse gênero, produzem poucas flores por dia, durante algumas semanas. Suas flores têm aroma forte e abrem-se ao pôr-do-sol (antese noturna), entre 17 e 22 horas. No dia seguinte, por volta do meio-dia, as flores perdem o cálice, a corola e os estames (LEE; LANGENHEIM, 1975).

A reprodução por sementes predomina em *Hymenaea* L. No entanto, a espécie do presente estudo (*H. stigonocarpa*) recorre, de forma facultativa, à reprodução vegetativa (LEWINSOHN, 1980). Os frutos em *Hymenaea* L. são do tipo vagem, indeiscentes, ovóides a oblongos, de cor marrom quando maduros e verdes quando imaturos, com endocarpo farináceo cobrindo as sementes ovóides a elipsóides de testa dura e lisa marrom a marrom escuro (LEE; LANGENHEIM, 1975). O tamanho dos frutos atinge o tamanho máximo dois meses depois da fertilização. Contudo, os frutos permanecem nas árvores por mais 6 ou 8 meses, tempo necessário para a maturação completa das sementes (LEE; LANGENHEIM, 1975).

Quanto à dispersão das sementes, ocorre por água doce (igapós e várzeas na Amazônia) e também por mar. Em terra, a dispersão é predominantemente zoófila – roedores e outros mamíferos, como porcos do mato, quebram as vagens, que contêm a polpa farinácea, e as ingerem junto com as sementes. No trato digestivo, são escarificadas pela solução ácida, ocorrendo a quebra da dormência (LEE; LANGENHEIM, 1975).

2.3 Importância econômica do gênero *Hymenaea* Linnaeus

As resinas de cor amarela e avermelhada, produzidas pelas árvores do gênero *Hymenaea* L., são produtos economicamente valiosos. Podem ser usadas em esculturas, na fabricação de jóias (índios pré-colombianos já as utilizavam para esses fins), como cimento, incenso, e até, quando dissolvidas em xilol, no preparo de lâminas permanentes para a microscopia (LEE; LANGENHEIM, 1975). Conhecidas também como copal sul americano são utilizadas na fabricação de vernizes e com fins medicinais (LANGENHEIM; LEE; MARTIN, 1973). A extração ocorre por meio do processo de sangria do tronco ou por escavação do solo, onde a resina se acumula. Nesse gênero, a resina pode converter-se em âmbar. Foram encontradas resinas fósseis datadas do Terciário na Colômbia, México e Brasil (CASTELENN, 2005).

Segundo Rizzini (1971), as espécies pertencentes a este gênero fornecem boa madeira para a marcenaria e carpintaria e mesmo na indústria naval. Índios amazônicos utilizam a casca, que pode chegar a 4 cm de espessura, na fabricação de canoas. As folhas e pedaços de casca macerados em cachaça são utilizados com fins medicinais, e a polpa farinácea é comestível e utilizada no preparo de bolos e biscoitos.

2.4 *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne

A *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, conhecida como jatobá-do-cerrado, jutaí, jatobá-capo, jatobá-de-cascafina, jitaí ou jutaicica é uma espécie da família das Leguminosae-Caesalpinoideae (CARVALHO, 2007).

A espécie *H. stigonocarpa* ocupa formações abertas do Cerrado (ALMEIDA et al., 1998), sendo uma espécie lenhosa endêmica deste Bioma. Ocorre em solos secos e em solos de fertilidade química baixa (CARVALHO, 2007), tendo pouca resistência a baixas temperaturas. Apresenta ampla abrangência latitudinal ocorrendo naturalmente nos estados brasileiros do Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Pernambuco, São Paulo (CARVALHO, 2006) (Figura 2), sendo encontradas também no Paraguai (LEE; LANGENHEIM, 1975) e Bolívia (CARVALHO, 2007).

São conhecidas atualmente três variedades dessa espécie - *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* Mart., *Hymenaea stigonocarpa* var. *brevipetiolata* N.F. Mattos e *Hymenaea*

stigonocarpa var. *pubescens* Benth. (LEE; LANGENHEIM, 1975). Cabe destacar a grande variação intrapopulacional, e até entre folhas de uma mesma árvore. A pilosidade e tomentosidade variam com a idade do indivíduo, e com a idade e grau de sombreamento da folha individual (LEWINSOHN, 1980). Por essa razão, a variação intra-específica não parece ser adequadamente demarcada para estas três variedades.

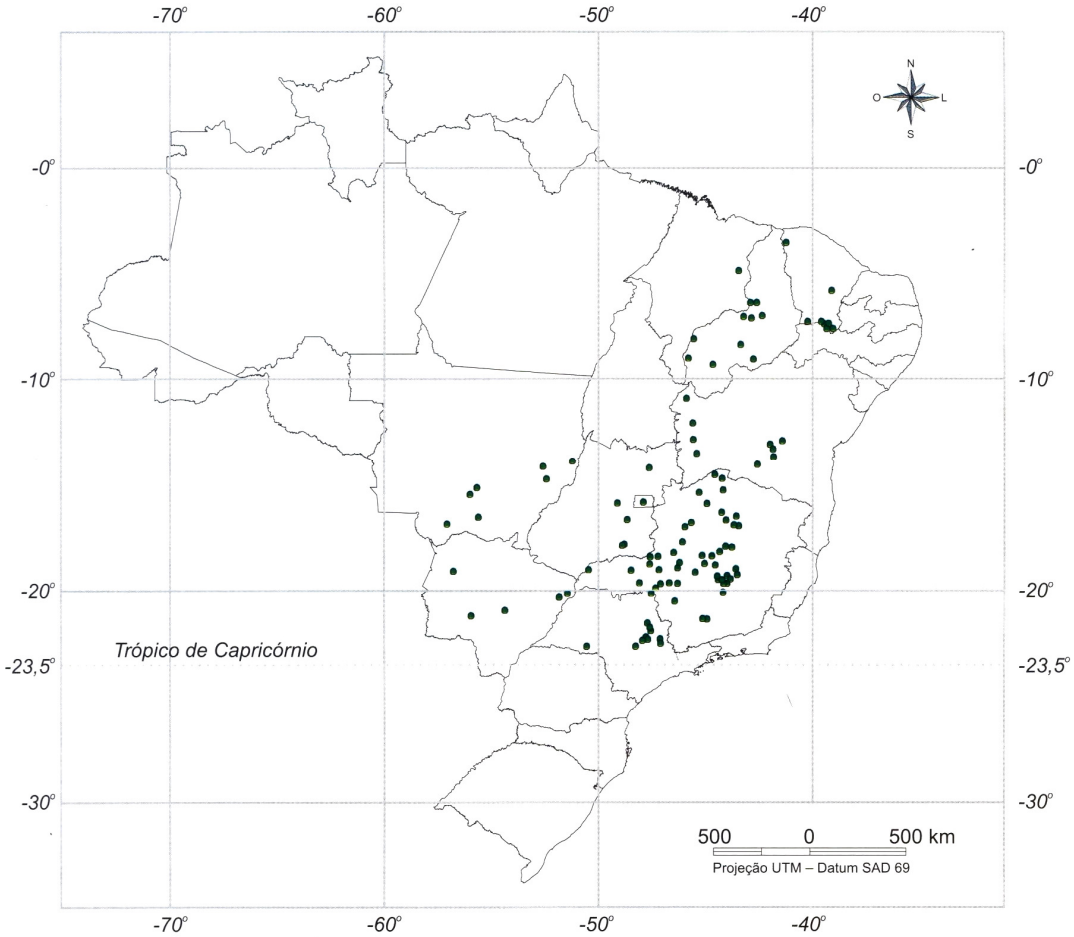

Figura 2 - Locais de ocorrência natural de *H. stigonocarpa* no Brasil (CARVALHO, 2006)

A árvore da espécie *H. stigonocarpa* é hermafrodita, de pequeno a médio porte, com tronco tortuoso, atingindo de três a 20 m de altura na idade adulta (LEE; LANGENHEIM, 1975) e 50 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30 m do solo), na idade adulta (Figura 3a). Suas folhas são compostas, com um par de folíolos coriáceos, glabros ou densamente pilosos

nas duas faces, com lâminas bastante grandes (cerca de 24 x 16 cm ou mais) (Figura 3b), com pontuações translúcidas imersas em todo o limbo (LEE; LANGENHEIM, 1975).

Paiva e Machado (2006) identificaram pela primeira vez no gênero *Hymenaea* L. a presença de nectários extraflorais (NEF) nas folhas de *H. stigonocarpa*. Os NEF estão distribuídos por todo o limbo, sendo mais concentrados nos terços basal e médio de cada folíolo e têm atividade secretora limitada à fase juvenil da folha, tornando-se não funcionais nas folhas mais velhas. Os NEF, por serem expostos e acessíveis, atraem formigas, que, por sua vez, defendem essa fonte de alimento contra predadores (PAIVA; MACHADO, 2006).

H. stigonocarpa usualmente forma agrupamentos de indivíduos, estes agrupamentos podem conter mais de 20 indivíduos (LEWINSOHN, 1980; DEFAVARI et al., 2007). A ocorrência destes agrupamentos pode ser relacionada à propagação vegetativa. Segundo LEWINSOHN (1980), a espécie apresenta raízes gemíferas que lhe facultam a reprodução vegetativa. Este autor comprovou a ocorrência de ligações subterrâneas entre indivíduos aparentemente distintos em uma população de *H. stigonocarpa* no município de Matinho Prado, Estado de São Paulo.

A densidade de indivíduos por hectare pode variar de 0,005 e 0,01, no Estado de São Paulo (DEFAVARI et al., 2007; MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2007) a 50 na região de Cuiabá, MT, (OLIVEIRA FILHO, 1989).

Segundo Lee e Langenheim (1975), a espécie apresenta as maiores flores encontradas no gênero. Possui inflorescências em cimeira terminal, bracteada, contendo até 30 flores, com pétalas pouco excedentes ao cálice (CARVALHO, 2007) (Figura 3b). Em cada inflorescência abrem de uma a cinco flores por noite, perdendo suas pétalas na manhã seguinte (OLIVEIRA, 2006). As flores secretam néctar a partir de um disco nectarífero localizado na base do pistilo e acumulado no hipanto (GIBBS; OLIVEIRA; BIANCHI, 1999). Lee e Langenheim (1975) sugeriram, com base no tipo de inflorescência, na largura da flor e na presença de um nectário no hipanto, que a *H. stigonocarpa*, assim como em outras dez espécies do gênero, seriam polinizadas por morcegos.

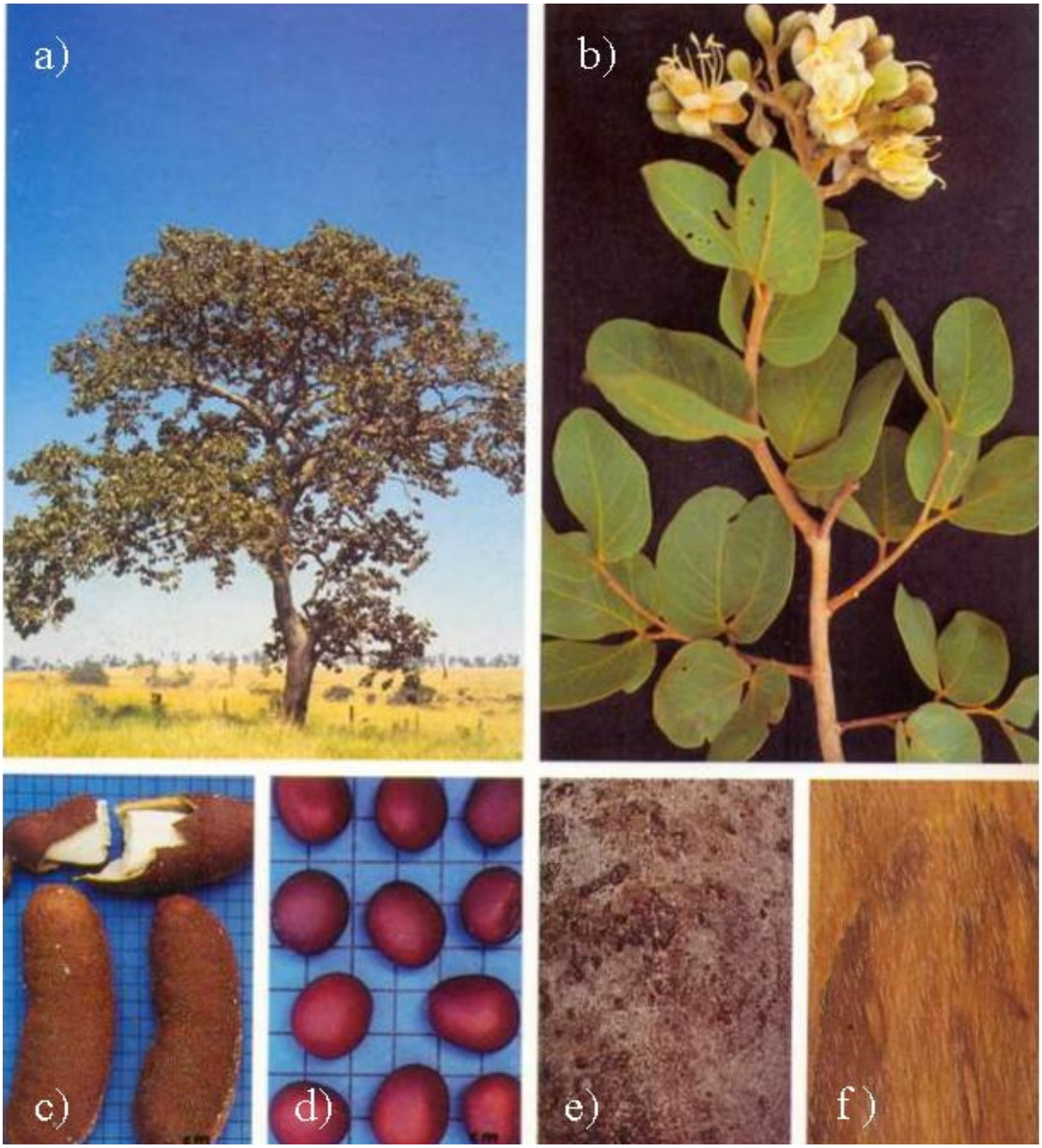

Figura 3 - Indivíduo adulto (a), folhas e flores (b), frutos (c), sementes (d), tronco (e) e madeira (f) de *H. stigonocarpa* (LORENZI, 2002)

Figura 4 - Polinização de flor de *H. stigonocarpa* por morcego (GIBBS; OLIVEIRA; BIANCHI, 1999)

A visitação de morcegos e mariposas às flores de *H. stigonocarpa* foi observada por Gibbs, Oliveira e Bianchi (1999) (Figura 4). Contudo, aparentemente apenas os morcegos entram em contato com as anteras e os estigmas durante a visita. Quatro espécies de morcegos foram observadas visitando as flores - os especializados *Glossophaga soricina* e os menos especializados frutívoros *Platyrhinus lineatus* e *Carollia perspicillatta.* Além dessas espécies, Oliveira (2006), observou a polinização por morcegos das espécies *Artibeus jamaicensis*, *Artibeus lituratus* e *Sturnira lillium* (Stenodermatinae). Lewinsohn (1980) observou a visitação de vespídeos e esfingídeos, constando que estes não eram, de fato, polinizadores da *H. stigonocarpa*.

Conforme Gibbs, Oliveira e Bianchi (1999), dentre as cinco espécies do grupo de quiropterófilas de cerrados brasileiros, a *H. stigonocarpa* é a única que apresenta floração durante a estação chuvosa (janeiro-março). A espécie é preferencialmente alógama, autocompatível e existem indícios de seleção pós-zigótica nas flores autofecundadas.

Quanto à floração e frutificação de *H. stigonocarpa*, ocorrem variações conforme a região e regime de chuvas. No Estado de São Paulo, a floração ocorre entre janeiro e fevereiro (LEWINSOHN, 1980; MORO, 2007); entre outubro e dezembro, no Mato Grosso do Sul (MATTOS et al., 2003); de outubro a abril, no Distrito Federal (ALMEIDA et al., 1998), e em dezembro, no Piauí.

A maturação dos frutos ocorre entre novembro e dezembro em São Paulo (LEWINSOHN, 1980; MORO, 2007); de abril a julho, no Distrito Federal (ALMEIDA et al., 1998); de julho a novembro, em Mato Grosso do Sul (MORAES et al., 2001; MATTOS et al., 2003), e em agosto, em Minas Gerais. Nessa espécie, os frutos são do tipo legume seco, indeiscente, monospérmico ou polispérmico (mais comum), alongado, ápice arredondado ou levemente retuso, medindo 8,7cm a 20cm de comprimento, 2,1cm a 6,5cm de largura e 2,0cm a 4,3cm de espessura; a textura é rugosa devido à presença de pontuações, pequenas, salientes e arredondadas; apresenta a linha de sutura proeminente circundando todo o fruto; a cor varia do castanho-avermelhado ao marrom-escuro (Figura 3c). Em cada fruto, ocorrem de uma a treze sementes (LEWINSOHN, 1980; CARVALHO, 2007).

As sementes de *H. stigonocarpa* são castanho-avermelhadas, globosas, largo-oblongas, obovadas, comprimidas, com ápice arredondado ou levemente truncado e base arredondada ou afinada; superfície irregular, com algumas depressões, medindo 17,8mm a 28,4mm de comprimento e 9,3mm a 19,7mm de espessura (Figura 3d). O número de sementes por quilo varia de 290 a 320 (LORENZI, 2002). Botelho et al. (2000), estudando cinco procedências, encontrou uma variação média de 238 a 338 por quilo.

Os frutos de *H. stigonocarpa* atraem periquitos, papagaios, bugios, roedores, lobinhos e insetos, sendo estes possíveis dispersores e pela grande interação com a fauna *H. stigonocarpa* pode ser útil nos plantios em áreas degradadas destinadas à recomposição da vegetação arbórea (LORENZI, 2002; SILVA et al., 1994; BOTELHO et al., 2000). Além disso, os frutos e as sementes de jatobá-do-cerrado são alvo dos ataques de coleópteros. No solo, as sementes podem ser destruídas por cupins, quando começa a germinação (HERINGER; FERREIRA, 1975). Vários fungos foram identificados nessa espécie: *Handersonia hymenaea*, *Camosporium handersonoides*, *Aphanopeltis baubinae*, *Asteromella ovata*, *Dictyosporium hymenearum*, *Johansonia anadelpha* e *Plenotrichella penseae* (HERINGER,1971).

2.5 Importância econômica de *H. stigonocarpa*

A madeira do jatobá-do-cerrado é de excelente qualidade, muito dura e resistente, sendo empregada em cercas, esteios e postes (Figura 3f). As resinas dessa espécie são utilizadas na indústria de vernizes. Pelo processo de cocção extrai-se tinta cor cango-avermelhada, utilizada na

tintura de fios de algodão. A casca do tronco é ainda utilizada para fabricação de canoas (CARVALHO, 2007).

Várias partes da *H. stigonocarpa* (casca do caule, resina, polpa dos frutos, sementes) são amplamente utilizadas por populações tradicionais do Bioma Cerrado para solucionar problemas típicos rurais como diarréia (antidiarréico), verminoses (vermífugo), doenças respiratórias (expectorante) doenças do aparelho reprodutor (afrodisíaco), inflamações (antiinflamatório, cicatrizante), além de utilizadas para tratar doenças como cistite, anemia, asma (VIEIRA; MARTINS, 2000; GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

As sementes de *H. stigonocarpa* são envoltas pelo arilo, amarelo-esverdeado, macio, fibroso-farináceo, com cheiro característico e sabor doce, constituindo a polpa (CARVALHO, 2007). Esta polpa apresenta alto teor de fibras totais, porém baixo teor de proteínas e lipídios (MATUDA; NETTO, 2005). O elevado conteúdo de fibra alimentar da farinha de jatobá-do-cerrado resulta em grande potencial para utilização na preparação de produtos como "cookies" e "snacks" (CHANG et al., 1998; SILVA; SILVA; CHANG, 1998; SILVA; SILVA; CHANG, 1999). Na alimentação, utiliza-se a polpa farinácea do fruto, bastante apreciada pela população rural que a ingere *in natura* ou e na forma de geléia, licor, farinha para bolos, pães e misturada ao leite sob a forma de mingau (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2002).

2.6 Diversidade genética em populações naturais

O termo biodiversidade surgiu no final da década de 80 e define variações em todos os níveis de organizações dos organismos. Segundo Primack (1993) a biodiversidade ou diversidade biológica refere-se à variedade de formas de vida presente na Terra (diversidade de espécies), aos genes que as constituem (diversidade genética) e aos ecossistemas dos quais são parte (diversidade de ecossistemas).

A diversidade de ecossistemas engloba variedade, número e freqüência de habitats, além de processos ecológicos e comunidades bióticas. Já a diversidade de espécies considera as variações entre os ecossistemas e as adaptações nos diferentes nichos ecológicos. E em termos genéticos, a diversidade envolve informações sobre seqüências de DNA, e consequentemente a estrutura do genoma, diferenças e similaridades entre indivíduos de uma espécie, incluindo

especiações e as suas interações entre organismos que compõem as comunidades (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; VALOIS; NASS; DE GOES, 2001).

O desenvolvimento da civilização humana ao longo dos últimos dois séculos provocou a transformação de grandes áreas naturais em paisagens antrópicas, resultando em um processo de fragmentação dos habitats que modificou a estrutura, distribuição e funcionamento dos ecossistemas naturais (SAUNDERS; HOBBS; MARGULES, 1991). Conseqüências imediatas deste processo incluem a perda de habitat, a formação de manchas remanescentes de habitat com variadas formas e tamanhos, uma redução no tamanho das populações, e um aumento no grau de isolamento das populações remanescentes, imersas em uma matriz antropogênica (MCGARIGAL; CUSHMAN, 2002; FAHRIG, 2003). Fatores estes considerados os principais responsáveis pela da perda de biodiversidade nos ecossistemas terrestres em todo o planeta (SALA et al., 2000).

A diversidade genética é introduzida continuamente nas populações por mutação, recombinação e fluxo gênico e pode ser perdida por deriva genética, endocruzamentos e pela maior parte dos tipos de seleção natural (NEI, 1987). As forças que geram e amplificam a variabilidade genética são fundamentais para o processo evolutivo, pois a adaptação de cada espécie ao longo das gerações depende da existência da variabilidade sobre a qual a seleção natural possa atuar (BRAMMER, 1993). Quando populações se mantêm em condições isoladas ao longo de várias gerações pode ocorrer à redução da diversidade genética devido à seleção e ao aumento da endogamia. Em populações de polinização cruzada, a endogamia pode acarretar no aumento de alelos deletérios recessivos, e por conseqüência, tem-se a diminuição da fecundidade, aumento da mortalidade de sementes e plântulas, redução da taxa de crescimento dos indivíduos, eventualmente conduzindo as populações à extinção (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996).

A partir das últimas décadas ouve um crescente interesse em avaliar as conseqüências genéticas da fragmentação de habitas em plantas como podemos constatar em diferentes trabalhos sobre o assunto (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996; SEOANE et al., 2005; MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2007; MARTINS et al, 2008, dentre outros). Esta preocupação tem levantado questões sobre tópicos como: a fragilidade genética de populações pequenas, estratégias genéticas para a conservação de espécies ameaçadas e problemas correlatos, que naturalmente demandam informações sobre a variabilidade genética de populações naturais (MATIOLI, 2006).

A genética de populações tornou-se uma ferramenta importante devido a sua finalidade de descrever a variação genética em populações e estudar os mecanismos de manutenção desta variabilidade (NEI, 1987). Para espécies arbóreas tropicais, diversos autores relatam que o conhecimento do nível de variação genética e da sua distribuição permite direcionar estratégias de melhoramento, maximizar os ganhos genéticos e manejar as populações naturais por meio do uso racional e sustentável dos recursos, visando à conservação genética (DIAS; KAGEYAMA, 1991; GRIBEL, 2001). Para tanto, a principal ferramenta para avaliar como esta variabilidade encontra-se distribuída dentro e entre as populações são os marcadores moleculares (SEBBENN, 2001; TELLES et al., 2003). Entre os marcadores moleculares, os microssatélites (SSR) são os que possuem todas as características desejáveis a serem utilizadas esses estudos, por apresentarem alto polimorfismo, serem codominantes e seletivamente neutros (POWELL; MACHRAY; PROVAN, 1996), além disso, são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, ou seja, "PIC" (*Polymorphism Information Content*) na terminologia de marcadores moleculares (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As análises de variabilidade genética a partir de marcadores microssatélites são comumente realizadas utilizando-se os seguintes parâmetros: número de alelos por loco (*A*), porcentagem de locos polimórficos (*P*), heterozigosidade observada (*Ho*), heterozigosidade esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (*He*), o índice de fixação (*f*) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC).

O número de alelos por loco (*A*) e a porcentagem de locos polimórficos (*P*) têm sido empregados como índices de diversidade em populações naturais no sentido de caracterizar e comparar os níveis de variação genética nestas populações (CONTE, 2004). Autores como Weir (1996) e Nei (1973) consideram a freqüência de heterozigotos um importante indicador de diversidade genética, pois cada heterozigoto carrega alelos diferentes representando melhor a variação existente tanto em populações de espécies autógamas como alógamas.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (BOTSTEIN et al., 1980). O valor do PIC varia de 0 para perfis monomórficos, até 1 para perfis altamente polimórficos. Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos e valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

Já o índice de fixação (*f*) mede o excesso ou a deficiência de heterozigotos em relação ao esperado no modelo equilíbrio de Hardy–Weinberg. Por sua vez, o teorema de Hardy–Weinberg assume as premissas de tamanho populacional efetivamente infinito; os indivíduos cruzam-se ao acaso; os alelos são igualmente competentes na síntese de cópias de si mesmos (isto implica ausência de seleção) e não ocorre introdução de novas cópias de qualquer alelo a partir de fonte externa, ou seja, não há migração ou mutação. Segundo FUTUYMA (1992) as discrepâncias entre uma população "ideal" de Hardy-Weinberg e as populações reais são os ingredientes da evolução. Dessa forma, tomando-se como referência o teorema de Hardy-Weinberg, as principais forças microevolutivas podem ser tomadas como causadoras de desvios deste equilíbrio. Ou seja, a distribuição espacial e temporal desta diversidade é influenciada por forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam na população interferindo na distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo (HAMRICK, 1982).

2.7 Estrutura genética

A migração ou fluxo gênico promove a homogeneidade genética, enquanto a mutação, a deriva genética e a seleção favorecem adaptações às condições ambientais locais que podem levar à diferenciação genética de populações (FUTUYMA, 1992). Fatores intrínsecos à espécie, como mecanismo de dispersão de pólen e sementes, sistema de reprodução, distribuição espacial, tamanho efetivo, bem como alguns fatores ambientais também podem influenciar ou direcionar a forma como a diversidade genética está distribuída (estruturada) (HAMRICK, 1982).

O uso do termo estrutura genética tem sido usado de várias maneiras, entre as diversas definições, uma das mais abrangentes e ao mesmo tempo sucintas foi dada por Loveless e Hamrick (1984), como distribuição não casual de alelos ou genótipos no tempo e no espaço. Esta pode apresentar-se estruturada espacialmente em diferentes escalas, tais como: populações, subpopulações ou entre indivíduos vizinhos devido aos sistemas de reprodução e dispersão, e também história de vida das espécies, gerando um maior grau de parentesco dentro dos grupos do que entre os grupos.

Vários são os métodos estatísticos 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 freqüências 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.

As estatísticas *F* de Wright possibilitam a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), bem como dos valores médios de endogamia em nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}), (WRIGHT, 1965).

A avaliação da divergência em diferentes níveis hierárquicos e a obtenção de estimativas não viesadas de endogamia são obtidas por meio dos coeficientes de coancestria de Cockerham (θ), (COCKERHAM, 1969; VENCOVSKY, 1992; WEIR, 1996). E através da análise da diversidade genética em populações subdivididas é possível a comparação dos níveis de heterozigosidade entre e dentro das populações, bem como a obtenção de uma estimativa de divergência (G_{ST}), a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas de F_{ST} e θ (NEI, 1977).

Recentemente, uma estatística análoga ao θ de Cockerham tem sido utilizada em estudos com marcadores microssatélites. Trata-se da estatística R_{ST} que comporta em seu cálculo o "*stepwise mutation model" – modelo passos de mutação* – proposto por Slatkin, (1995) em que a mutação para um novo alelo de um determinado marcador microssatélite ocorre em passos, assim alelos com tamanhos mais próximos são considerados mais similares do que os alelos com tamanhos mais distantes (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002).

2.8 Fluxo gênico

O fluxo gênico pode ser definido como um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento efetivo de genes de uma população para outra (SLATKIN, 1985), ou seja, é uma medida da fertilização, no caso de pólen, ou estabelecimento de indivíduos férteis, no caso de sementes, em razão da distância percorrida da fonte até o local onde a dispersão ocorreu (LEVIN; KERSTER, 1974). Ao movimentar a informação genética contida nos gametas (pólen) e (ou) nos embriões (sementes, rizomas, estolões), o fluxo gênico promove a homogeneização da diversidade genética das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção. O fluxo

gênico contribui também para o aumento da diversidade genética, já que introduz novas combinações alélicas nas populações (MARTINS, 2005; GARANT; FORDE; HENDRY, 2007).

O fluxo gênico pode ser quantificado por métodos diretos: via marcadores morfológicos e análise da paternidade, e por métodos indiretos via fluxo gênico realizado ou aparente (F_{ST}; G_{ST}; θp; R_{ST}), alelos privados, autocorrelação espacial, análise TWOGENER e por meio de marcadores organelares.

A análise de paternidade tem sido o método direto mais empregado no estudo de fluxo gênico via pólen. Esta análise usualmente emprega genótipos multilocos para inferir os pais de progênies de sementes de mães conhecidas, fornecendo a descrição da estrutura individual com detalhes. Para isso utiliza-se de locos genéticos para identificar o mais provável pai de um conjunto de pais candidatos e após a identificação deste, pode-se ter uma idéia do padrão de movimento do pólen na população (DICK et al., 2008). A estatística Delta (Δ), definida por Marshall et al. (1998), auxilia na determinação da paternidade e é baseada no método da máxima probabilidade que tolera erros de genotipagem e define o indivíduo com mais chance de ser o pai com base nas freqüências alélicas. A análise considera o número de candidatos a pai, a proporção de indivíduos amostrados e as falhas ou erros nos dados genéticos.

Os métodos indiretos são baseados na estrutura genética das populações, sendo eles via F_{ST}, alelos privados e estrutura genética espacial. O F_{ST} é empregado para estimar o número de migrantes por geração (*Nm)* para um conjunto de populações ou de subpopulações. Este também é chamado de fluxo gênico aparente ou realizado. O uso de alelos privativos para avaliação do fluxo gênico foi descrito por Slatkin (1985), e é baseado na freqüência média de alelos que são exclusivos de uma ou poucas populações (alelos raros). A freqüência destes alelos é utilizada para estimar a média do número de migrantes permutados entre as populações. Para estimar o fluxo gênico através da estrutura genética espacial são geralmente utilizadas as análises de autocorrelação espacial, utilizando o índice *I* de Moran que quantifica a similaridade genética entre pares de indivíduos espacialmente adjacentes (DINIZ-FILHO; TELLES, 2006), o coeficiente de coancestria recente que se baseia na probabilidade de se amostrarem aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência (θ_{xy}) e as estatísticas *Sp* que é o coeficiente de regressão baseada na análise do coeficiente de coancestria recente (VEKEMANS; HARDY, 2004).

Outro método indireto que avalia a distância de dispersão de pólen é através da análise TWOGENER (SMOUSE et al., 2001), que baseia-se na divergência genética do conjunto de alelos contido no pólen das árvores-mãe (Φ_{ft}). Esse método é útil para estudar o fluxo gênico via pólen quando há dificuldade de localizar todos os indivíduos potencialmente reprodutivos e para testar estatisticamente diferenças entre médias de distâncias de dispersão de pólen entre locais e ambientes (DYER et al., 2004).

De acordo com Sork, Nason e Campbell (1999) estimativas de fluxo gênico também têm sido realizadas utilizando marcadores organelares (cpDNA e mtDNA), que possuem predominantemente herança unilateral, em diversos trabalhos (por exemplo HAMILTON, 1999; CLOUTIER et al., 2005; MARTINS et al., 2006; AZEVEDO et al., 2008).

2.9 Estrutura genética de populações de plantas clonais

A reprodução assexuada em plantas ocorre fundamentalmente de duas maneiras diferentes: por reprodução vegetativa 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 (SILVERTOWN, 2008). Já a agamospermia é a produção partenogênica de sementes, também conhecida como apomixia (no sentido estrito), que consiste na produção de sementes sem que ocorra a polinização, sendo, portanto, clones da planta-mãe (RICHARDS, 1997).

Existem várias evidências que indicam a ampla distribuição e ocorrência da reprodução vegetativa nas savanas. Uma das principais características destas plantas é a grande produção de caules oriundos de órgãos subterrâneos. 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 determinando momento se tornarão fisiologicamente independentes (rametes) (JAMES, 1984). O tempo de duração da conexão vascular entre as plantas-mães e os filhos varia dentro e entre espécies (SILVERTOWN, 2008).

A rebrota de raízes confere a ocupação horizontal do espaço, mas esta distância é relativamente curta, comparada à probabilidade de alcance na dispersão de pólen e propágulos, já que está restrita à arquitetura do sistema subterrâneo (LACEY; JOHNSTON, 1990). Penha

(1998) verificou uma distância máxima de seis metros em relação ao tronco principal. Porém, distâncias maiores que 20 m foram observados por Rodrigues et al. (1999).

Considerando a hipótese de que os clones emitidos a partir de raízes crescem e atingem a maturidade reprodutiva, algumas possibilidades podem ser apontadas em relação a mudanças nos padrões de biologia reprodutiva e, por conseqüência, na diversidade genética destas populações. Nas espécies com sistema misto de reprodução sexuada, por exemplo, a reprodução vegetativa a partir de raízes poderia gerar um aumento nas taxas de endogamia, devido ao cruzamento entre aparentados (HANDEL, 1985). Certamente podem ocorrer também autofecundações entre rametes diferentes ou entre o gemete e o ramete, desde que houver compatibilidades.

Revisões sobre diversidade genética em plantas clonais (DIGGLE; LOWER; RANKER, 1998; KHUDAMRONGSAWAT; TAYYAR; HOLT, 2004) têm demonstrado que essas populações não são geneticamente empobrecidas. Estudos teóricos confirmam que a diversidade genética, medida pelo número de alelos por loco ou heterozigosidade, não diminui e pode até aumentar com o aumento da assexualidade se os clones forem heterozigotos (BALLOUX; LEHMANN, 2003). No entanto, dados mostram que a diversidade de genótipos é reduzida pela reprodução assexuada, podendo algumas populações tornar-se homogêneas geneticamente.

Apesar do 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 particularmente evolutivos de plantas clonais eram dissuadidos pela dificuldade em discriminar indivíduos geneticamente distintos e repetições clonais, ou seja, discriminar genetes e rametes (ARNAUD-HAOND et al., 2007). O advento e posterior desenvolvimento de marcadores genéticos poderosos o suficiente para identificar a identidade genotípica tem agora estimulado os esforços de investigação da estrutura genética de populações de plantas clonais (ARNAUD-HAOND et al., 2007).

Esta crescente demanda de trabalhos publicados nessa área, especificamente com plantas clonais, foi constatada por Arnaud-Haond et al. (2007), por meio de uma pesquisa bibliográfica no ISI Web of Knowledge, onde este autor constatou 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 advento do uso de marcadores microssatélites, marcadores estes considerados os mais poderosos ainda disponíveis para essa

finalidade. Porém, Arnaud-Haond et al. (2007) ressaltam que a maior parte dos artigos caracterizava a estrutura genética de populações clonais através da computação de índices gerais de estrutura genética, tais como heterozigosidade, estimativas de endogamia ou análise de autocorrelação espacial, sendo estes métodos desenvolvidos para organismos não clonais e, portanto, não explicitamente abordavam a questão da clonalidade. Estes autores ainda ressaltam que as implicações da clonalidade na natureza dos organismos estudados são tão complexas que afetam o estudo da genética populacional ainda na fase de coleta das amostras, aspecto este geralmente não abordado, possivelmente levando a erros na utilização e interpretação dos índices aplicados.

De maneira geral, os softwares disponíveis para estudos de genética de populações não incluem, no geral, análises e opções para organismos clonais, sinal da falta de conhecimento suficiente das especificidades da clonalidade e da necessidade de um conjunto de índices e métodos específicos (ARNAUD-HAOND et al., 2007). Alguns softwares específicos foram desenvolvidos nos últimos anos, permitindo a análise de alguns componentes em nível intrapopulacional de clones MLGSIM (STENBERG; LUNDMARK; SAURA, 2003); GENALEX (PEAKALL; SMOUSE, 2006) GENOTYPE e GENODIVE (MEIRMANS; VAN TIENDEREN, 2004); GENCLONE 2.0 (ARNAUD-HAOND; BELKHIR, 2007).

2.10 Genética da conservação

Durante as últimas duas décadas, o papel da genética na biologia da conservação e na ecologia em geral, tem sido muito enfatizado (HEDRICK 2001; FRANKHAM 2005). Contribuições importantes para a compreensão dos efeitos da fragmentação dos habitats que acompanham a erosão genética e o risco de extinção, a dinâmica de adaptação das espécies às novas condições ambientais foram unidas, formando uma nova disciplina científica: a genética da conservação cujo objetivo é gerar estudos que atuem como base para a compreensão de processos populacionais e evolutivos relevantes para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (OUBORG; VERGEER; MIX 2006).

De maneira aplicada as informações sobre a variabilidade genética das espécies e de como esta se encontra distribuída permitem: identificar e compreender o sistema sexual e reprodutivo, avaliar possíveis ocorrências de hibridização ou introgressão, estimar riscos genéticos de extinção, fornecer estratégias de translocação/reintrodução de espécies em programas de

recuperação, assim como: identificar populações vulneráveis ou prioritárias para conservação, estimar o tamanho efetivo populacional e determinar a área mínima viável de reservas, entre outros.

No decorrer desses 20 anos do surgimento da Genética da Conservação, mais de 2.600 trabalhos já foram desenvolvidos dentro deste ramo da ciência (ISI WEB OF KNOWLEDGE, 2008). No Brasil os principais trabalhos foram desenvolvidos na Mata Atlântica por ser um Bioma altamente ameaçado. Mas atualmente os estudos estão abrangendo todos os Biomas, principalmente a Amazônia e o Cerrado, por causa da grande fragmentação de áreas ocorrida nos últimos anos.

Os primeiros trabalhos voltados para conservação genética no Brasil foram baseados na estimativa da variabilidade genética dentro e entre populações e sistemas reprodutivos utilizando marcadores moleculares alozímicos (ver revisão em KAGEYAMA et al., 2003, entre outros). A substituição de marcadores alozímicos por marcadores microssatélites, assim como os recentes avanços teóricos, a criação de novos programas computacionais e métodos quantitativos, e o aumento do poder estatístico permitiram que os dados obtidos a partir das análises genéticas se tornassem mais dinâmicos e informativos (ZHANG; HEWITT, 2003; PERTOLDI; BIJLSMA; LOESCHCKE, 2007).

Conseqüentemente, os recentes trabalhos buscam estudar novas ou mais amplas abordagens tais como: entender de que forma a diversidade genética é gerada dentro das populações; quantificar com maior precisão as possíveis distâncias de fluxo gênico das espécies via pólen e sementes, assim como estudar o fluxo gênico histórico e contemporâneo; detectar a existência de propagação assexuada dentro de populações e suas interferências nos índices de diversidade genética e finalmente aplicar de forma conjunta estes conhecimentos a fim de delinear eficientes estratégias de conservação genética em longo prazo (por exemplo, KAGEYAMA, 2003; ZUCCHI et al., 2005; MARTINS, et al. 2006; AZEVEDO, 2006; entre outros).

2.11 Marcadores microssatélites

Microssatélites ou SSR (Seqüências Simples Repetidas) são também conhecidos como STR (*Short Tandem Repeat*), SSLP (*Single Sequence Length Polymorphisms*), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) ou STMS (*Sequence Tagged Microsatellites*) e foram descritos pela primeira vez no ano de 1989 por três diferentes grupos de pesquisadores: Litt; Luty (1989); Weber; May (1989); Tautz (1989). Microssatélites são repetições de pequenas seqüências de um a seis nucleotídeos adjacentes, repetidos em série (*tandem*) e que podem ser encontrados amplamente distribuídos, de forma aleatória, pelo genoma da maior parte dos eucariotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002), tanto em regiões codificantes de proteínas quanto em regiões não codificantes. Estes autores constataram, em um estudo com 34 espécies de plantas, que os microssatélites estão associados, predominantemente, a regiões não codificantes do genoma, sendo rara sua ocorrência em regiões codificadoras de proteínas.

Os microssatélites são cerca de cinco vezes menos abundantes em plantas do que em humanos, onde ocorre um microssatélite (maior que 20 pb) a cada 6 Kb. Nas monocotiledôneas, é esperado um microssatélite a cada 65 Kb enquanto nas dicotiledôneas, um a cada 21 Kb. O dinucleotídeo AT/TA é o mais comum nas plantas, seguido de AA/TT e GA/CT. Já o dinucleotídeo GT/CA é significativamente menos abundante nas plantas e o mais freqüente em humanos (PINTO et al., 2001).

Os microssatélites são classificados de acordo com o tipo de repetição em perfeitos, imperfeitos, interruptos ou compostos. Uma seqüência microssatélite perfeita é aquela que não é interrompida por qualquer base que não seja o motivo da repetição (ex. TATATATATATATATA). Enquanto que, no microssatélite imperfeito, há uma interrupção de um par de bases que não pertence ao motivo (ex. TATATATA<u>CT</u>ATATA); já no interrupto, há uma pequena seqüência dentro do motivo (ex. TATATA<u>CGTG</u>TATATATATA). Um microssatélite composto contém duas seqüências de repetição adjacentes diferentes (ex. GTGTGTGTTATATATA) (OLIVEIRA et al., 2006).

Apesar de serem normalmente considerados como evolutivamente neutros, a significância funcional de alguns microssatélites tem sido demonstrada, especialmente para os microssatélites compostos por três nucleotídeos (LI et al., 2002). Microssatélites 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), ou com algumas doenças humanas (JARNE; LAGODA, 1996; OLIVEIRA et al., 2006).

Os microssatélites representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais a taxas muito maiores do que as observadas nas seqüências de cópia única (PINTO et al., 2001), variando de 10^{-6} a 10^{-2} mutações por geração, sendo que a maioria é causada por alterações no número das unidades de repetição (EISEN, 1999). Acredita-se que esta instabilidade surge através de um mecanismo específico de mutação chamado deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase (TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994), que ocorre durante a replicação do DNA e conduz ao aumento ou à diminuição do número de repetições. Outra provável causa é o pareamento não homólogo das seqüências durante o "crossing-over" (EISEN, 1999).

Ainda que as regiões microssatélites estejam sujeitas a altas taxas de mutação, as seqüências de DNA que flanqueiam os SSR são geralmente conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores (*primers*) específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BOREM; CAIXETA, 2006).

O polimorfismo dos marcadores microssatélites é revelado por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR), por amplificação do DNA genômico total, utilizando-se dois *primers* únicos, compostos de seqüências curtas de nucleotídeos, que flanqueiam e, portanto, definem o loco de microssatélite. As reações de amplificação podem ser iniciadas com pequenas quantidades de DNA e os produtos da amplificação são separados em géis de agarose e visualizados por meio de iluminação ultravioleta após coloração com brometo de etídeo (PINTO et al., 2001). A separação pode também ser feita em gel de poliacrilamida (PINTO et al., 2001) e as bandas visualizadas por meio de coloração com nitrato de prata (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), ou detecção por fluorescência em analisador automático (seqüenciador). Pode ser utilizado ainda um sistema de eletroforese capilar (RAPOSO, 2007). O uso de analisadores automáticos seja por eletroforese capilar ou com uso de gel de poliacrilamida apresenta vantagens sobre as metodologias convencionais incluindo: minimização da manipulação manual, rapidez e precisão na geração dos dados e análise simultânea de vários locos (AZEVEDO, 2006).

A interpretação de géis de microssatélites pode ser considerada simples. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. Como cada loco é definido por um par de iniciadores (*foward/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 ocorrência de alelos nulos ou silenciosos pode levar a interpretações errôneas dos géis. Por definição, um alelo nulo é qualquer alelo que falha em amplificar em reações PCR e ocorre devido a uma mutação na seqüência iniciadora do loco. Como conseqüência, indivíduos heterozigotos que possuam um alelo nulo serão considerados erroneamente como homozigotos, o que diminui a variabilidade genética observada em populações avaliadas por locos microssatélites (JARNE; LAGODA, 1996). Neste caso, alelos nulos podem ser detectados em estudos populacionais pelo teste de aderência das freqüências observadas nas proporções de Hardy-Weinberg (PINTO et al., 2001), ou pela observação e comparação direta dos genótipos maternos com os de suas progênies.

A homoplasia de microssatélites é outro caso que pode causar distorções nas estimativas a respeito da estrutura genética de populações e filogenia de espécies (ESTOUP; JARNE; CORNUET, 2002). Isto se deve à alta taxa de mutação em locos microssatélites e ao fato do número de repetições possíveis nestes locos terem um limite (BALOUX; LUGON-MOULIN, 2002). Isso ocorre quando alelos de locos microssatélites com o mesmo número de repetições, não necessariamente com um ancestral comum, são idênticos por simples acaso (ESTOUP; JARNE; CORNUET, 2002).

Apesar de poder ocorrer essas dificuldades de interpretação, os microssatélites possuem características altamente desejáveis como descritas anteriormente e, por apresentar essas características, os marcadores microssatélites têm sido cada vez mais utilizados como um instrumento eficaz para a compreensão da estrutura genética de populações, fluxo gênico, grau de parentesco, 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).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites para uma nova espécie exige isolamento, clonagem, seqüenciamento e caracterização dos locos. Várias metodologias estão disponíveis para melhorar a eficiência do enriquecimento e isolamento de bibliotecas genômicas de microssatélites, mas os custos ainda são elevados (ZANE et al., 2002). Entretanto, a conservação das regiões flanqueadoras dos microssatélites pode ocorrer entre espécies relacionadas, possibilitando a utilização de iniciadores específicos em outras espécies pertencentes a um mesmo gênero ou entre gêneros de uma mesma família (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), esta transferibilidade entre locos é conhecida como amplificação heteróloga (CIAMPI, 1999).

Esta característica dos marcadores microssatélites permitiu que inúmeros estudos genéticos populacionais fossem realizados com espécies que não possuíam marcadores específicos desenvolvidos. Em espécies do Cerrado, podemos citar como exemplos Collevatti, Brondani e Grattapaglia (1999) que obteve sucesso na transferibilidade de iniciadores desenvolvidos para *Caryocar brasilienses* em *Caryocar coriaceum*, *C. edule*, C. *glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosum*; Zucchi et al. (2002) de *Eucalyptus spp* para *Eugenia dysenterica*; Martins et al. (2006) de *Capsicum spp* para *Solanum lycocarpum*; Medeiros, Pereira e Collevatti (2006) de *Tabebuia aurea* para *Tabebuia ochracea*, *T. serratifolia*, *T. impetiginos* e *T. roseo-alba*; Ciampi et al. (2008) de *Hymenaea courbaril* para *Hymenaea stigonocarpa*, entre outros.

2.12 Marcadores cloroplastidiais

A estrutura genética em populações de plantas está altamente relacionada ao padrão de migração de pólen e sementes que ocorrem entre e dentro das populações (CLOUTIER et al., 2005). O DNA de cloroplasto é de origem predominantemente materna em Angiospermas, sendo

disperso via sementes, o que permite elucidar as contribuições do fluxo de sementes e de pólen para a estrutura genética de populações naturais, comparando marcadores cloroplastidiais e nucleares (ENNOS et al., 1999; AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). Pode também ser um bom indicador histórico de pontos de estrangulamento, de efeito fundador e de deriva genética (PROVAN; POWELL, 2001).

Os genomas plastidiais são tipicamente não recombinantes, além de serem efetivamente haplóides (OLSMSTREAD; PALMER, 1994). As seqüências do genoma de cloroplasto são altamente conservadas e têm sido consideradas como uma ferramenta universal para avaliar a estrutura genética dentro e entre populações (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008), apresentando altos níveis de variabilidade intraespecífica em diversos estudos (PROVAN; POWELL, 2001).

Nos últimos anos, pesquisas referentes à genética de populações de plantas utilizando cpDNA têm sido desenvolvidas com maior freqüência (AZEVEDO et al., 2008). Resultados obtidos utilizando cpDNA em plantas dos trópicos sugerem que os modelos espacial-temporal de variação no genoma de cloroplasto são produtos de dispersão de sementes histórica e contemporânea (CLOUTIER et al., 2005).

Weising e Gardner (1999) desenvolveram marcadores microssatélites (SSR) de cloroplasto universais para Angiospermas. Estes marcadores permitem verificar a herança materna de plantas como, por exemplo, o estudo de Martins et al. (2006) que estudaram diversidade haplotípica em populações naturais de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil, e puderam verificar quais delas haviam sido fundadas por um maior número de sementes. Martins (2005), por meio de estudo com populações naturais e em indivíduos situados em margem de estradas, pôde inferir sobre a distância de migração de sementes em *S. lycocarpum*. Provan et al. (1999) realizaram estudo com cpSSR para contrastar com os resultados obtidos com cpRFLP para *Pinus torreyana* Parry ex Carrière, e comprovando que essa espécie é descendente de uma população original monomórfica.

Em *Annona crassiflora* Mart. (araticum) pôde-se observar elevada diversidade genética em termos de polimorfismo de cpDNA, porém, apesar dessa alta diversidade genética, as populações se encontravam em um eminente processo de diferenciação como resultado provável da fragmentação pelo qual seu ambiente de origem (Cerrado) vem passando nos últimos anos (BLANCO et al., 2007). Pereira (2007) utilizou SSR nuclear para *A. crassiflora* e, também,

detectou divergência genética relativamente alta e significativa para essa espécie, corroborando com os autores supracitados. Azevedo et al. (2008) encontraram resultados semelhantes para estudos com cpDNA e SSR nuclear em *Manilkara huberi* (Ducke) Chevalier; estes autores indicam a presença de estruturação genética espacial em sua população de estudo e ainda afirmam que a população estudada foi fundada por subpopulações, resultantes de fluxo gênico restrito.

Cloutier et al. (2005) verificaram estruturação genética em *Carapa guianensis* Aubl., espécie dispersa por hidrocoria, e sugeriram limitado fluxo gênico via sementes, que levaram os autores a discutir que isso, provavelmente, ocorre pelo fato de que a hidrocoria não ocorre em larga escala e que muitos indivíduos em terras altas não tem a oportunidade de dispersar suas sementes a longas distâncias.

Ramos, Lemos-Filho e Lovato (2009) detectaram três haplótipos em comum entre as espécies *Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, indicando que as espécies são muito similares, havendo maior divergência entre populações de mesma espécie que entre espécies diferentes, o que levou os autores a sugerir que a diferenciação dessas espécies de *Hymenaea* é recente. Porém, esses mesmos autores, ainda, sugerem revisão taxonômica para esse gênero.

Esses são alguns trabalhos desenvolvidos recentemente em que se pode verificar a contribuição que os marcadores cloroplastidiais têm dado à genética de populações. Apesar desses estudos terem aumentando nos últimos anos, ainda são poucos os trabalhos referentes ao tema, em especial ao Cerrado. De acordo com Martins (2005), no Cerrado a eficiência na dispersão de sementes para fundação de novas populações de plantas naturais é um fator muito importante, devido às constantes queimadas que ocorrem nesse Bioma, pois ajuda a manter a variabilidade genética e a persistência de espécies em longo prazo. Sendo assim, o estudo de populações de plantas nativas do Cerrado, utilizando cpDNA, é importante para o conhecimento histórico e contemporâneo desse Bioma.

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 5). Ambas localizam-se em Estações Ecológicas e Floresta Estadual 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 *H. stigonocarpa* 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 Coutinho (1978).

O levantamento de possíveis populações de *H. stigonocarpa* em Unidades de Conservação no Estado de São Paulo foi realizado, primeiro, a partir de consultas em materiais depositados em herbário e busca bibliográfica de levantamentos florísticos realizados. A posterior localização dos indivíduos de *H. stigonocarpa* se deu por meio de viagens a campo e comunicação pessoal com técnicos e pesquisadores das Estações Ecológicas.

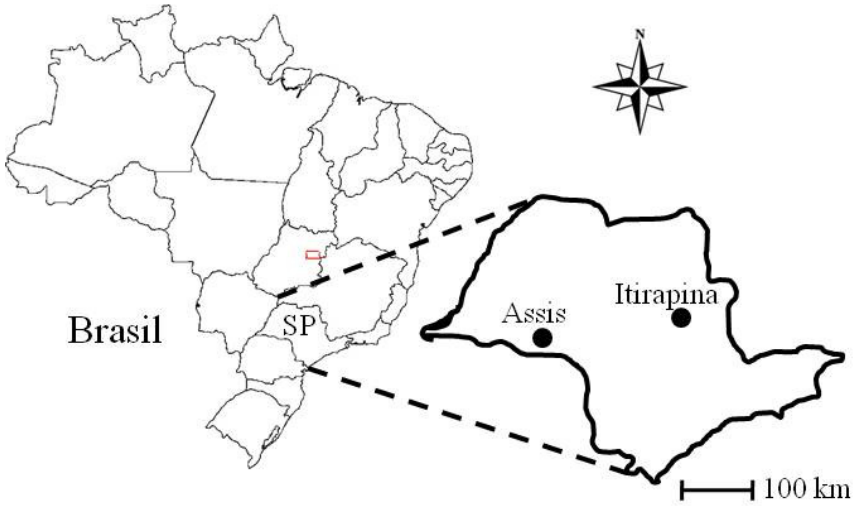

Figura 5 - Mapa da localização geográfica dos municípios de Assis-SP e Itirapina-SP

3.1.1 Estação Ecológica de Itirapina

A Estação Ecológica de Itirapina (EEI) (22º15`S; 47º49`) pertence ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo. Criada pelo Decreto de nº22. 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 6), constituída principalmente por fisionomias abertas de cerrado (*lato sensu*), particularmente campo cerrado, campo sujo e campo limpo, além de algumas manchas localizadas de cerradão e cerrado (*stricto sensu*) (TANNUS; ASSIS; MORELLATO, 2006). 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). O entorno da EEI inclui monoculturas de *Eucalyptus spp* e *Pinus spp*, (localizados na Estação Experimental de Itirapina, situada 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 quente e chuvoso, com precipitação média anual de 1.450,1 mm e temperatura média de 21°C. A estação chuvosa compreende o período de outubro a março, enquanto a estação seca inclui o período de abril a setembro (CEPAGRI/UNICAMP, 2006).

Dentro da EEI foi realizado um censo de 680 ha onde todos os indivíduos de *H. stigonocarpa* foram marcados com plaquetas metálicas, devidamente numeradas e georreferenciados com auxílio de um aparelho GPS (Garmin GPSMAP 76S). Foi utilizado o programa de georeferenciamento GPS Trackmaker (FERREIRA, 2002) para transferir os dados do aparelho GPS para o computador. Os indivíduos que se encontravam dentro de reboleiras e muito próximos entre si foram mapeados manualmente, usando-se coordenadas X e Y a partir de um ponto de referência. Após a marcação dos indivíduos, foram medidas as circunferências na altura da base (CAB) usando-se uma fita métrica e as alturas usando-se uma régua dendrométrica.

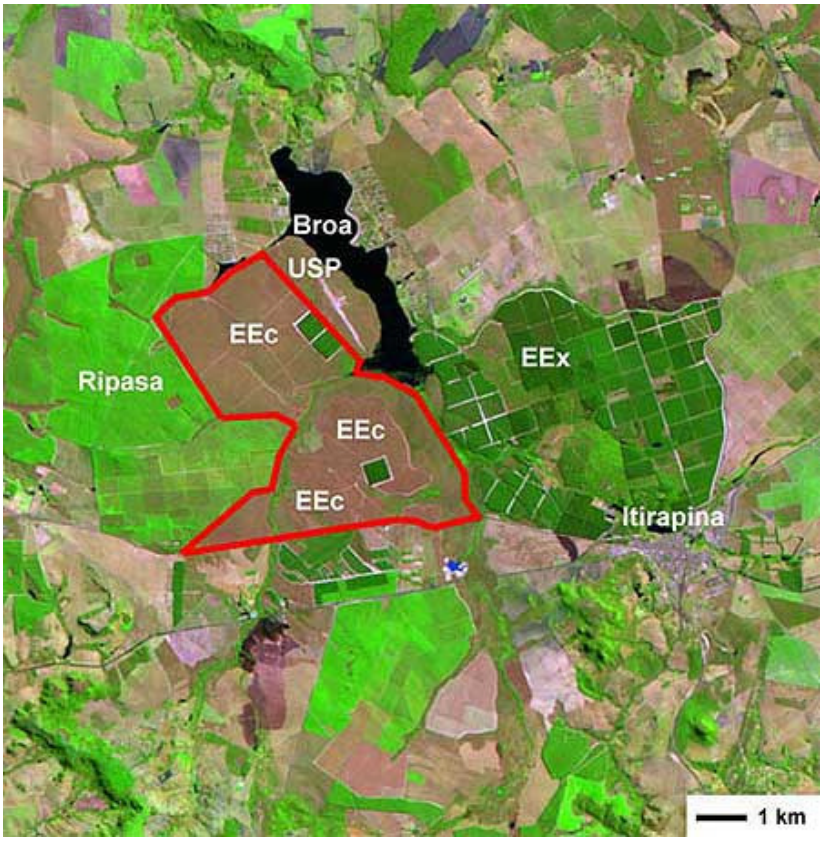

Figura 6 - Localização aérea da Estação Ecológica de Itirapina (contorno em vermelho) no município de Itirapina-SP

Para realização de análises genéticas com uso de marcadores microssatélites (SSR), todas as amostras foliares e sementes coletadas foram armazenadas em sacos de papel devidamente identificados com o número da árvore de origem. As amostras foliares foram secas imediatamente em recipientes contendo sílica gel (previamente secas em estufa à 85º C por 48 horas) e encaminhadas ao Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas - LARGEA, onde ficaram armazenadas até a realização das análises. Os frutos coletados foram beneficiados e germinados no LARGEA e as mudas foram acondicionadas em laboratório até a realização das análises. A coleção testemunha foi depositada no herbário do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP.

3.1.2 Estação Ecológica de Assis e Floresta Estadual de Assis

A Estação Ecológica de Assis (EEA) está localizada no município de Assis, no Oeste do Estado de São Paulo. Criada pelo Decreto Estadual de nº 35.687, de 21 de setembro de 1992, com área de 1.312,38 ha a partir do desdobramento da área então denominada Estação Experimental de Assis. Em 2002 a área foi ampliada pelo Decreto Estadual nº 47.097 de 18 de Setembro de 2002, com a incorporação de antigos talhões de *Eucalyptus spp* e *Pinus spp*, passando a ocupar 1.760,64 ha (INSTITUTO FLORESTAL, 2008) (Figura 7). A ampliação da área teve como principal objetivo a preservação de mananciais, uma vez que a área incorporada contém a principal nascente que abastece a população urbana do município de Assis (VITALLI, 2007).

De acordo com o Instituto Florestal (2005), o Cerrado da EEA é considerado muito rico e diversificado, com cerca de 200 espécies de árvores distribuídas em seus 1.760,64 ha e muitas outras de arbustos e ervas, riqueza esta conseqüência da diversidade de fisionomias e da condição ecotonal. A EEA possui vegetação predominante de cerradão, mas apresenta também cerrado *stricto sensu* e tipos florestais ripários como mata de brejo e mata ciliar. Situando-se nas coordenadas de latitude 22º35´S e longitude 50º22´W, é uma das áreas mais ao sul do país a apresentar este tipo de ambiente. Suas altitudes variam de 500 à 590m. Possui dois tipos de solo: Latossolo Vermelho Distrófico e Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico típico, ácidos e de baixa fertilidade, com elevados teores de alumínio.

Por sua vez, a Floresta Estadual de Assis (FEA) (Figura 7) possui 2.719,36 ha e tem como objetivo a produção de madeira dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* para múltiplos usos. Contudo, a FEA apresenta inúmeras manchas de cerrado *stricto senso* e mata ciliar, protegidas pelo Instituto Florestal de São Paulo.

No decorrer do presente estudo, as unidades de conservação Estação Ecológica de Assis e Floresta Estadual de Assis, que juntas somam um total de 4.480 ha, foram consideradas uma única população, identificada como EEA.

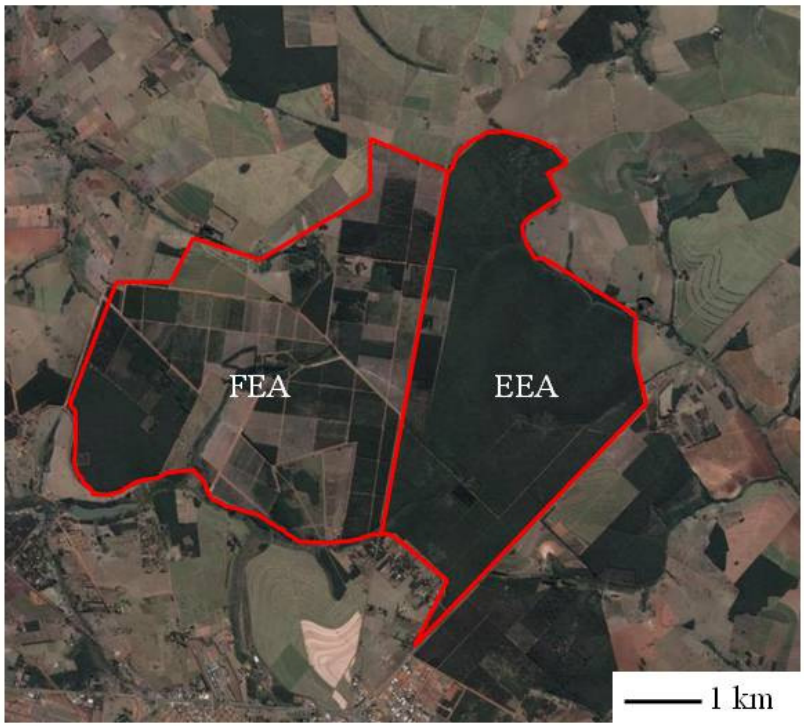

Figura 7 - Localização aérea da Estação Ecológica de Assis (contorno em vermelho) no município de Assis-SP

O levantamento de indivíduos deu-se por caminhamento por todas as estradas dentro da EEA e da FEA, onde foram coletadas amostras foliares de 47 indivíduos de *Hymenaea stigonocarpa*, que foram marcados com plaquetas metálicas devidamente numeradas e georreferenciados com auxílio de GPS (Garmin GPSMAP 76S). Para a realização de análises genéticas, repetiu-se a metodologia utilizada para a população da EEI.

3.2 Coleta de sementes e produção de mudas

A coleta de frutos, com o objetivo de produzir progênies para se estudar o sistema de reprodução da espécie e fluxo gênico, foi realizada na população da EEI no mês de setembro de 2007. Os frutos foram coletados com o auxílio de uma tesoura de poda e trazidos para o LARGEA para que fosse feito o beneficiamento.

Para a extração das sementes, os frutos foram quebrados e as sementes foram deixadas em bandejas com água destilada por aproximadamente quatro horas, para a fermentação da polpa. A retirada da polpa foi feita através do atrito das sementes em peneira e após a limpeza passaram

por assepsia, com água sanitária, durante dois minutos. Posteriormente, para acelerar o processo germinativo, foi feita a escarificação manual das sementes com lixa, na extremidade oposta ao eixo-embrionário, com base no trabalho realizado por Guimarães *et al*. (1995), e embebidas em água destilada por 24 horas. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas de polietileno (Figura 8), tendo como substrato vermiculita autoclavada (80ºC por 24 horas). A iluminação empregada foi contínua, com luz branca fluorescente e à temperatura constante de 30ºC e luz constante em câmaras germinadoras (BOD).

Figura 8 - Sementes de *H. stigonocarpa* em processo de germinação nas bandejas de polietileno

Após a germinação das sementes, as plântulas foram transplantadas diretamente em sacos de polipropileno preto (15,0 x 25,0 x 0,1cm) (Figura 9) e como substrato utilizou-se terra de subsolo e esterco de boi curtido na proporção 3:1. As mudas foram regadas duas vezes por semana com água destilada e foram mantidas em bancadas no laboratório até o momento da extração.

Figura 9 - Semeadura das plântulas de *H. Stigonocarpa* em sacos de polipropileno

Após uma semana da transferência das plântulas para os sacos de polietileno, teve inicio a morte dos indivíduos de forma muito rápida, tendo sido constatada como causa a infestação por fungo. Após consulta pessoal com a equipe do viveiro de mudas do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, foi tomada a decisão de se pulverizar as mudas com solução de fungicida Benlate® 0,1% do princípio ativo (Benonil). A morte dos indivíduos continuou de forma rápida e houve a necessidade de dar início a extração de DNA das amostras, incluindo os indivíduos mortos, para o desenvolvimento das análises genéticas.

3.3 Procedimentos laboratoriais

3.3.1 Extração e quantificação do DNA

Para a realização das análises genéticas foram coletadas folhas jovens de todos os indivíduos *H. stigonocarpa* presentes em 680 ha da EEI (n = 68) e de suas progênies (n = 97) e para a população da EEA foram coletadas folhas jovens de todos os indivíduos encontrados no caminhamento (n = 47). A extração do DNA genômico total das amostras foi realizada a partir de cerca de 150 mg de tecido vegetal macerado com nitrogênio líquido. O protocolo utilizado foi o CTAB descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), de acordo com as seguintes etapas: (1) Em tubos do tipo *eppendorffs* de 1,7 ml, devidamente identificados para cada amostra, foram adicionados 700 µL de tampão de extração (pré-aquecido a 65ºC) nos cerca de 150 mg do tecido macerado, então agitados para ressuspender o tecido no tampão; (2) foram levados ao banho-

maria (65ºC) 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 600 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 15.000 rpm; (5) o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo tubo também identificado; (6) foram adicionados 400 µl de isopropanol frio (mantido a -20ºC) e homogeneizado suavemente até formar um precipitado; (7) os tubos foram armazenados em freezer (-20ºC) por 60 minutos; (8) posteriormente foram centrifugados durante 15 minutos a 15000 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 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de RNAse (15mg/mL) e deixado sobre bancada *overnight*. As amostras foram então armazenadas a -20ºC.

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 (DNAλ), submetidos à eletroforese durante 25 minutos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (Figura 10). Posteriormente foram diluídos em água MiliQ a concentração de 2,5ng/µl.

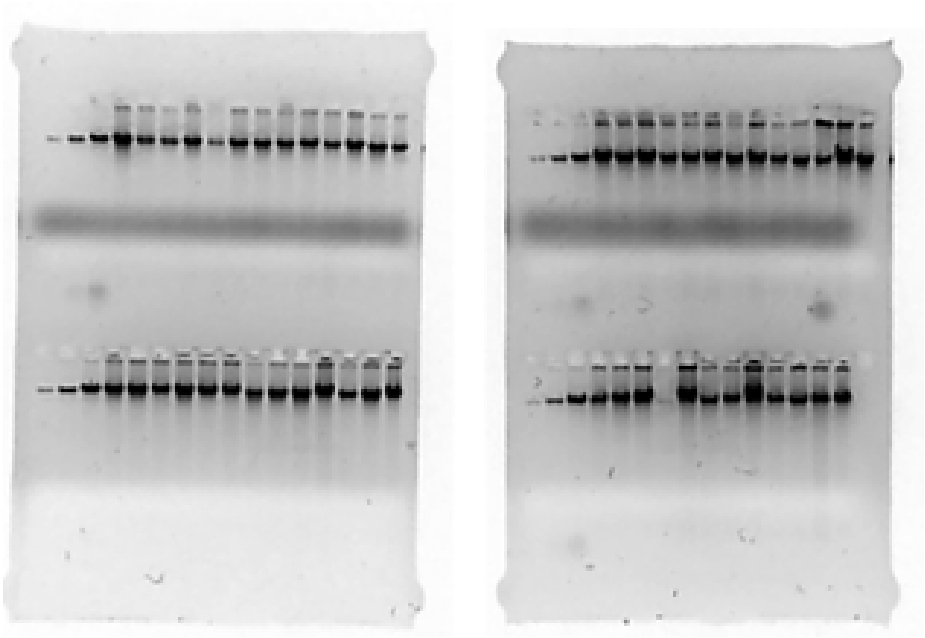

Figura 10 - Perfis de DNA de indivíduos de *H. stigonocarpa* para quantificação. Géis de agarose corados com brometo de etídeo. As três primeiras colunas apresentam concentrações ascendentes de λ DNA: 20, 100, e 300 ng/µl, respectivamente

3.3.2 Amplificação dos locos microssatélites

Uma vez que ainda não foram desenvolvidos iniciadores que amplificam regiões de microssatélites para *H. stigonocarpa*, foi testada a transfereabilidade de iniciadores desenvolvidos para *Hymenaea courbaril*. As seqüências destes iniciadores foram obtidas pela Dra. Ana Y. Ciampi no Laboratório de Genética de Plantas da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, com base na análise de amostras de indivíduos adultos de *Hymenaea spp* (SUGANUMA; CIAMPI, 2001), sendo que apenas parte destas seqüências já se encontra publicada (CIAMPI et al., 2008).

O coquetel (13µl) para a realização da PCR foi composto por 7,5ng de DNA genômico, 250µM de dNTPs, 0,5µM de $MgCl_2$, tampão para PCR 1X (10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 1,5mM de $MgCl_2$, pH 8.3), 2,5µg/ml de BSA, 0,2µM de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria). As amplificações foram realizadas em termociclador do tipo MJ Research PTC-100, utilizando-se o seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 29 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica de cada par de iniciadores por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e terminando com 72°C por 7 minutos. Após a amplificação, os fragmentos de

DNA foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 5%, em corrida de uma hora e trinta minutos em tampão TBE 1X em cuba vertical. Os fragmentos foram observados na forma de bandas, após coloração com nitrato de prata, seguindo o protocolo desenvolvido por Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001). O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10-pb "ladder" - Invitrogen®). Fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

Para as análises com microssatélites cloroplastidiais foram utilizados cinco pares de iniciadores desenvolvidos para angiospermas dicotiledôneas por Weising e Gardner (1999). As condições de amplificação, eletroforese, coloração e interpretação dos locos foram similares às realizadas para microssatélites nucleares.

4 ANÁLISE DOS DADOS

4.1 Aspectos demográficos

Com a finalidade de se conhecer a distribuição de indivíduos nas áreas estudadas, ou a afinidade destes por alguma fisionomia de Cerrado, assim como comparar esta distribuição entre as áreas, foi calculado o índice de dispersão de Clark-Evans conforme Clark e Evans (1954): form. (1)

$$R = \frac{R_O}{R_E} \qquad (1)$$

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

Onde:

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

$$R_O = \frac{\sum r_i}{n} \qquad (2)$$

r_i = distância do vizinho mais próximo

n = número de observação;

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

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

d = densidade média de indivíduos/m^2;

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

$$Z = \frac{|R_O - R_E|}{s} \qquad (4)$$

s = desvio padrão

4.2 Caracterização da diversidade genética

4.2.1 Descriminação de clones e diversidade clonal

Antes de estimar os vários parâmetros de caracterização da diversidade genética foi necessário discriminar possíveis clones nas populações da EEI e da EEA devido à presença de reboleiras na população da EEI e de indivíduos próximos na EEA. Desta forma, para que as estimativas não fossem comprometidas devido a réplicas nos genótipos, todas as análises de diversidade genética apresentadas nesta dissertação foram realizadas com a presença de clones e posterior retirada dos mesmos, a fim de conhecer a magnitude da influência da propagação clonal nas estimativas de diversidade genética e estrutura genética espacial. Foi utilizado o programa GenClone 2.0 (ARNAUD-HAOND; BELKHIR, 2007) para os cálculos relacionados com a discriminação de clones e análise da diversidade clonal.

Assim, genetes (indivíduos gerados por um zigoto) e rametes (partes potencialmente independentes de um genete) (ERIKSSON, 1993; SILVERTOWN; LOVETT-DOUST, 1993) foram discriminados através do método proposto por Young et al. (2002), que leva em conta o coeficiente de endogamia de Wright (1951). Desta forma, a probabilidade de genótipos multilocos distintos [$p_{gen}(F_{IS})$] serem idênticos ao acaso foi dado por: form. (5)

$$p_{gen}(F_{IS}) = \prod_{i=1}^{l} \left[(f_i g_i)\left(1 + \left(z_i \left(F_{IS(i)}\right)\right)\right)\right] 2^h . \qquad (5)$$

Em que, l representa o número de locos, h o número de locos heterozigóticos, f_i e g_i são as freqüências alélicas dos alelos f e g no i^{imo} loco (quando f e g foram idênticos para

homozigotos, $F_{IS(i)}$ e F_{IS} foram estimados para o i^{imo} loco através do método de reamostragem round-robin. Para locos homozigóticos z_i = 1 e para locos heterozigóticos z_i = -1).

A diversidade clonal foi calculada de acordo com Dorken e Eckert (2001): form. (6)

$$DC = \frac{G-1}{N-1}. \qquad (6)$$

Em que, *G* representa o número de genetes encontrados na amostra e *N* o número total de rametes 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. (7 e 8)

$$D^* = 1 - L, \qquad (7)$$

em que

$$L = \sum_{i=1}^{Gl} \left[\frac{n_i(n_i - 1)}{N(N-1)} \right]. \qquad (8)$$

Desta forma, *Gl* é o número de linhagens multilocos detectados em uma amostra, n_i é o número de amostras dentro das linhagens multiloco e *N* o número total de rametes amostrados. D* varia de 0 a $1-(1/Gl)$.

4.2.2 Diversidade genética e parâmetros afins

As estimativas das freqüências alélicas juntamente com o número de alelos por loco ($\hat{A}$), o número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = 1/\sum p_i^2$), das heterozigosidades médias observada ($\hat{H}_o$) e esperada ($\hat{H}_e$) e dos índices de fixação intrapopulacional ($\hat{f}_i$), foram realizadas empregando-se o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001). Para $\hat{f}_i$ estimado foi realizado o procedimento de 10.000 reamostragens do tipo "bootstrap" sobre os locos para obter os intervalos de confiança ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa computacional GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001). A taxa de cruzamento aparente foi estimada para indivíduos adultos a partir do $\hat{f}_i$ em cada amostra "bootstrap" como sugerido por Carlini-Garcia, Vencovsky e Coelho

(2001). 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).

4.2.3 Diversidade haplotípica

Cada combinação alélica única entre os cinco locos cpSSR analisados foi considerada um haplótipo. Cada haplótipo, por sua vez, foi analisado como um alelo diferente de um único loco haplóide. Foram estimados o número de haplótipos ($\hat{n}_h$), a quantidade de haplótipos privados por população ($\hat{n}_p$) e a proporção de alelos privados ($\hat{n}_p / \hat{n}_h$). A diversidade haplotípica ($\hat{h} = [n_k / (n_k - 1)](1 - \sum_i^n p_i^2)$ e o número efetivo de haplótipos ($\hat{n}_e = 1 / \sum p_{i.}^2$) foram estimados de acordo com Nei (1987), em que, n_k = o número de indivíduos amostrados na população k e p_i = a freqüência do i-ésimo haplótipo.

4.2.4 Detecção de gargalos genéticos

Para a detecção de reduções recentes no tamanho efetivo populacional foi utilizado o programa computacional BOTTLENECK (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999). Foram utilizados os métodos SMM (Modelo de Passos de Mutação) (OHTA; KIMURA, 1973) e TPM (Modelo de Duas Fases) (DI RIENZO et al., 1994) por serem mais apropriados para locos microssatélites. Foi utilizado o teste de significância de Wilcoxon com 1.000 iterações para SSM e TPM, uma vez que foram utilizados menos de 20 locos microssatélites como recomendado por Luikart e Cornuet (1998).

Segundo Piry, Luikart e Cornuet (1999), populações que tiveram reduções recentes no tamanho efetivo populacional exibem uma redução do número de alelos e da heterozigosidade nos locos polimórficos. Mas, o número de alelos é reduzido de maneira mais rápida do que a heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$). Quando $\hat{H}_e$ é maior que a heterozigosidade esperada no equilíbrio de mutação-deriva (H_{eq}) há indícios de deriva devido à redução populacional. H_{eq} é calculada a partir do número de alelos e $\hat{H}_e$ das freqüências alélicas. O programa computacional

BOTTLENECK (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999) testa a hipótese de $\hat{H}_e > H_{eq}$, sob diferentes modelos evolutivos.

4.2.5 Estrutura genética espacial

Para a análise da estrutura genética espacial (EGE) dentro das populações foi utilizado o programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). A caracterização da distribuição espacial dos genótipos dentro das populações foi realizada a partir das estimativas dos coeficientes de coancestria recente (θ_{xy}) com base em Loiselle et al. (1995) entre plantas dentro das classes de distância definida para cada *k* alelo em cada par de indivíduos, *x* e *y*, como: form. (9)

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \overline{p}_{lk})(p_{ylk} - \overline{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k (1 - \overline{p}_{lk})\overline{p}_{lk}} + \left[\sum_l \frac{1}{(2n_l - 1)} \right]. \quad (9)$$

Em que, p_{xlk} e p_{ylk} são as 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 $\overline{p}_{lk}$ a média da freqüência do alelo *k* no loco *l* na subpopulação com n_l (número de genes) no loco *l*.

O coeficiente de coancestria recente (θ_{xy}) com base em Loiselle et al. (1995) não é viesado pela presença de alelos raros na população. Foram realizadas 10.000 permutações sobre a localização de cada genótipo a fim de se obter intervalos de confiança.

4.2.6 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund

Na presença de estrutura genética espacial, o valor do índice de fixação tende a se elevar dentro da população devido ao efeito Wahlund (DICK et al., 2008; HARDY et al., 2006). Este índice de fixação intrapopulacional ($\hat{f}_i$) pode ser corrigido pela eliminação do efeito Wahlund usando a relação entre estatísticas *F* descrito em Bittencourt e Sebbenn (2007), onde a fórmula de Wright (1965) $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$ é derivada em $\hat{f}_N = 1 - [(1 - \hat{f}_i)/(1 - \hat{\theta}_{xy})]$ assumindo que $F_{ST} = \hat{\theta}_{xy}$, onde F_{ST} é a média do coeficiente de coancestria entre indivíduos de subpopulações e $\hat{\theta}_{xy}$ é o valor mais alto da estrutura genética espacial; $F_{IT} = \hat{f}_i$, já que o índice

de fixação intrapopulacional ($\hat{f}_i$) representa o índice de fixação total dentro de uma população estruturada (F_{IT}); e $F_{IS} = \hat{f}_N$, onde o novo valor corrigido do índice de fixação ($\hat{f}_N$) é a estimativa apenas relacionada com o sistema reprodutivo.

4.2.7 Tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação

Foram estimados os tamanhos efetivos populacionais ($\hat{N}_e$) para *H. stigonocarpa* nas populações EEI e EEA com base em Crossa e Vencovsky (1999): form. (10)

$$N_e = \frac{N}{1+\hat{f}}. \tag{10}$$

Em que, *N* é o número de indivíduos amostrados e $\hat{f}$ a estimativa do índice de fixação da população.

No caso de existência de coancestria entre indivíduos dentro da população, o tamanho efetivo populacional foi estimado segundo Sebbenn e Seoane (2005): form. (11)

$$\hat{N}_e = \frac{0{,}5n^2}{\left(1+\hat{f}\right)\left(0{,}5n + \sum_{x=1}^{n}\sum_{y\neq 1}^{n}\hat{\theta}_{xy}\right)}. \tag{11}$$

Em que, $\sum_{x=1}^{n}\sum_{y\neq 1}^{n}\hat{\theta}_{xy}$ corresponde à soma de todas as estimativas de coancestrias entre os pares de indivíduos de uma população, *n* o tamanho amostral e $\hat{f}$ a estimativa do índice de fixação da população.

A área mínima viável ($A\hat{M}V$) para conservação genética *in situ* foi estimada em função do tamanho efetivo de referência ($N_{e(ref)}$ = 1000, 500 e 50) proposto por Lynch (1996): form (12)

$$A\hat{M}V = \frac{N_{e(ref)}}{d\left(\hat{N}_e/n\right)}. \tag{12}$$

Em que, $\hat{N}_e / n$ = relação entre tamanho efetivo e tamanho amostral e d = densidade de indivíduos por hectare.

4.2.8 Fluxo gênico contemporâneo

Inferências sobre o fluxo gênico na população da EEI foram realizadas através da análise do genitor mais provável. Essa análise foi realizada nas plântulas originadas a partir das sementes coletadas em cada árvore matriz da população, utilizando o método de alocação categórica (SANCRISTOBAL; CHEVALET, 1997) através do programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). Para determinar os possíveis genitores, todos os *genetes* foram utilizados como candidatos. A paternidade foi determinada utilizando a estatística Δ (MARSHALL et al.,1998). Para encontrar o valor crítico de Δ para cada intervalo de confiança na análise de paternidade, foram realizadas simulações utilizando o programa CERVUS 3.0. Para estas simulações foram utilizadas 100.000 repetições, com uma proporção de 0,01 de erro de genotipagem por loco, um intervalo de confiança restrito de 95%.

A área efetiva de vizinhança para polinização ($\hat{A}_{ep}$) foi calculada para cada árvore matriz a partir da variância da dispersão de pólen (σ^2), assumindo uma área circular central ao redor da árvore matriz: $\hat{A}_{ep} = 2\pi\sigma^2$ (Levin, 1988).

4.2.9 Estrutura genética entre populações e fluxo gênico realizado

A estrutura genética e o fluxo gênico entre as duas populações foram calculados com a finalidade de propor se cada unidade de conservação representa uma unidade significativa evolucionária (USE) e/ou uma unidade independente para manejo (UIM) segundo classificações propostos por Palsboll, Bérubé e Allendorf (2007). Para esta finalidade, foram estimadas as divergências genéticas com a estatística F de Weir e Cockerham (1984) ($\hat{\theta}_P$= F_{ST}), segundo Slatkin (1995), com seu modelo para passos de mutação (R_{ST}) e as estatísticas de Nei (1987) de populações subdivididas (H_T = diversidade genética total, G_{ST} = diversidade genética entre e H_S diversidade genética dentro) utilizando o programa computacional FSTAT (versão 2.9.3) de Goudet (2001). Para estandardizar o valor G_{ST} foi utilizado o G_{ST}', proposto por Hedrick (2005):

form. (13)

$$G_{ST}' = \frac{G_{ST}(1+H_S)}{(1-H_S)} \qquad (13)$$

O fluxo gênico aparente ou realizado (*Nm*) entre populações foi estimado de forma indireta, segundo modelo de ilhas proposto por Crow e Aoki (1984), o qual corrige a análise para pequeno número de populações: form. (14)

$$\hat{N}m = \left(\frac{1}{4\alpha}\right)\left[\left(\frac{1}{\hat{F}_{ST}}\right) - 1\right], \tag{14}$$

em que $\hat{F}_{ST}$ é a divergência genética entre populações e (n) a correção para o número de populações, sendo: $\alpha = [n/(n-1)]^2$. Utilizaram-se os estimadores $\hat{\theta}_P$, $\hat{R}_{ST}$, $\hat{G}_{ST}$ e $\hat{G}_{ST}'$ no lugar do $\hat{F}_{ST}$, para conhecer a magnitude do fluxo gênico realizado e a variação dada por cada estatística.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos demográficos

Os resultados comparativos dos aspectos demográficos entre as populações da EEI e da EEA encontram-se na Tabela 1. Dentro de uma área de 680 ha na EEI foram encontrados 68 indivíduos de *H. stigonocarpa*, distribuídos em dez locais diferentes da Estação (Figura 11a). A maioria dos indivíduos da população estava disposta em reboleiras, ou seja, as árvores formam agrupamentos de 3 a 28 plantas (Tabela 2). Contudo, três indivíduos ocorrem 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 18,94 m, variando de 0,09 a 3,793 m e o índice de dispersão para os indivíduos foi significativo (R = 0,144**), indicando um alto grau de agregação. Contudo, a distribuição dos pontos (reboleiras) ocorreu de forma aleatória pela EEI (R = 0,799^{ns}) (Tabela 1) e a distância média entre pontos foi de 345,4 m, variando de 16 a 3.793 m. Os indivíduos apresentaram uma altura média de 3,33 m e a circunferência média na altura da base de 26,21 cm (Tabela 1).

Já na EEA, foram localizados 47 indivíduos na sua maioria em áreas mais abertas de Cerrado, onde a vegetação era menos densa, principalmente nas margens de pequenas estradas que cortam a Estação (Figura 11b). Em apenas três locais foram localizados indivíduos isolados, nos demais pontos o número de indivíduos variou entre 2 e 19 (Tabela 3). O índice de dispersão de Clark-Evans revelou uma distribuição agregada dos indivíduos pela EEA (R = 0,260**) com R_O = 118,14 m, variando de 1,26 a 8.368,46 m. Contudo, a distribuição dos pontos teve uma tendência à distribuição uniforme (R =1,623**) (Tabela 1) com R_O = 1.604 m, variando de 833 a 7.987 m. Os indivíduos apresentaram uma altura média de 5,27 m e a circunferência média na altura da base foi de 39,9 cm (Tabela 1).

Tabela 1 - Aspectos demográficos de *H. stigonocarpa* nas populações da EEI (Estação Ecológica de Itirapina) e da EEA (Estação Ecológica de Assis), SP

População	**N**	$R_{\text{indivíduos}}$	R_{pontos}	**CAB média (cm) (DP; Min. – Max.)**	**Altura média (m) (DP; Min. – Max.)**
EEI	68	0,144**	0,799^{ns}	26,21 (4,24; 1,6 – 64)	3,33 (0,53; 0,56 – 5,7)
EEA	47	0,260**	1,623**	39,9 (34,31; 3,8 – 142)	5,27 (3,03; 1 – 13)

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

Tabela 2 - Número de indivíduos de *H. stigonocarpa* encontrados em cada localidade (ponto) de coleta na Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP

Pontos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Nº de indivíduos	7	13	3	4	7	3	1	1	28	1

Tabela 3 - Número de indivíduos de *H. stigonocarpa* encontrados em cada localidade (ponto) de coleta na Estação Ecológica e Floresta Estadual de Assis, Assis-SP

Pontos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Nº de indivíduos	1	7	3	1	2	2	1	19	11

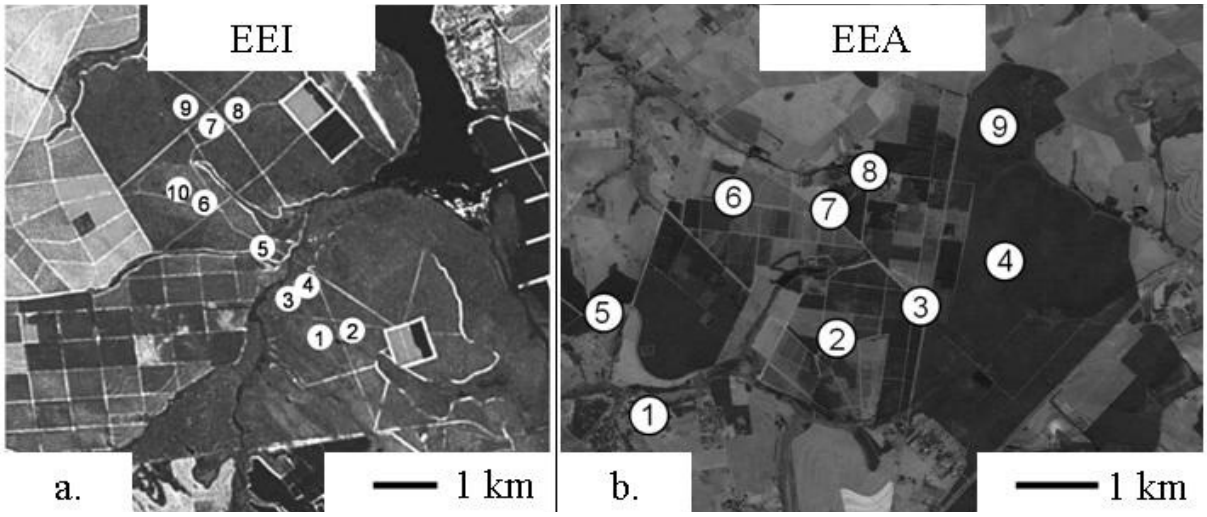

Figura 11 – a. Localização dos pontos de coleta (1 a 10) de *H. stigonocarpa* na população da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP; b. Localização dos pontos de coleta (1 a 9) de indivíduos de *H. stigonocarpa* na população da Estação Ecológica e Floresta Estadual de Assis, Assis-SP

Foram observados poucos indivíduos frutificando em toda a área da EEI (n = 5) e uma significativa variação na quantidade de sementes produzidas em cada matriz (Tabela 4). Além da coleta de todos os frutos das cinco matrizes, foram coletados frutos encontrados no chão da reboleira número 1, totalizando 97 sementes obtidas.

Tabela 4 - Número de sementes obtidas em cada matriz e seus respectivos pontos

Matriz	**Nº de sementes**	**Ponto nº**
Adulto 1	31	1
Adulto 4	7	1
Adulto 5	18	1
Adulto 6	12	1
Adulto 1	3	10
não identificado	26	1
Total	**97**	**2***

Nota: * Número total de pontos que tiveram indivíduos frutificando na população da Estação Ecológica de Itirapina em 2007

5.2 Transfereabilidade e amplificação dos locos microssatélites nucleares

Foram testados 14 iniciadores de *Hymenaea coubaril* em pelo menos duas temperaturas diferentes de anelamento cada um, visando eliminar a amplificação de regiões inespecíficas. Destes, três não transferiram (HC06, HC12, HC13) e 11 geraram fragmentos em *H. stigonocarpa,* ou seja, 78,57% de transferência. Dos 11 locos que amplificaram em *H. stigonocarpa*, foram selecionados oito pares de iniciadores que apresentaram fragmentos mais nítidos de interpretação e indícios de polimorfismo (Figura 12).

Os pares de iniciadores HC14, HC21 e HC25 não geraram locos passíveis de interpretação, devido à permanência de amplificações não específicas. O loco HC33 caracterizou-se monomórfico para os adultos e progênies (Figura 12a) da população da EEI e também da população da EEA. A maior amplitude alélica observada foi de 294 pares de base, para o loco HC 35 (Figura 12d); a menor amplitude foi observada para o loco HC49, com 94 pares de base (Figura 12h). O presente estudo foi realizado com a utilização de oito locos microssatélites nucleares (Tabela 5).

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')	Amplitude alélica (pb)**	T_a °C***	Acesso nº
Hc17	(TC)13	F: AACCGAGTCTCCCTCCATCT R: TGTCACAAGAATAGCAAGGGAG	112-152	58	EU244704
Hc33	(AG)16	F: GAACAAATCAACTTTCTTTGAAGC R: TTGACGCTTATTTTGCACCA	114-114	58	EU244706
Hc34	(TG)9(AG)12	F: CCAGCCCATGACGAAGT R: GGTGTCGTGTTGTGTATGGC	188-214	58	EU244707
Hc35	*	F: CTTGCACCTTTCACCCATTT R: CTCTTTGCTTCCCTCTCCCT	268-294	58	*
Hc40	(AG)26	F: CCTCTCTCCCAAATTCACGA R: TGCAATAGAATTTCCGAGGC	158-196	58	EU244708
Hc42	$(CA)_5T(AG)_{19}$	F: TGGCTAAAAGTTGGGAGGGT R: TTCCCCCTTTTCATGTTGTC	116-146	60	EU244709
Hc48	*	F: TTCCTTTCTTTGGTACTGTTGG R: CAAACTTCATTCTCCATCTTTTC	144-184	60	*
Hc49	*	F: CCACCTCTCTCCACCCAATA R: TGCGGGAACTGCTTAATTTG	94-110	60	*

*Dados não publicados.

**Amplitudes encontradas para *H. stigonocarpa* no presente estudo

***Temperaturas de anelamento utilizadas no presente estudo

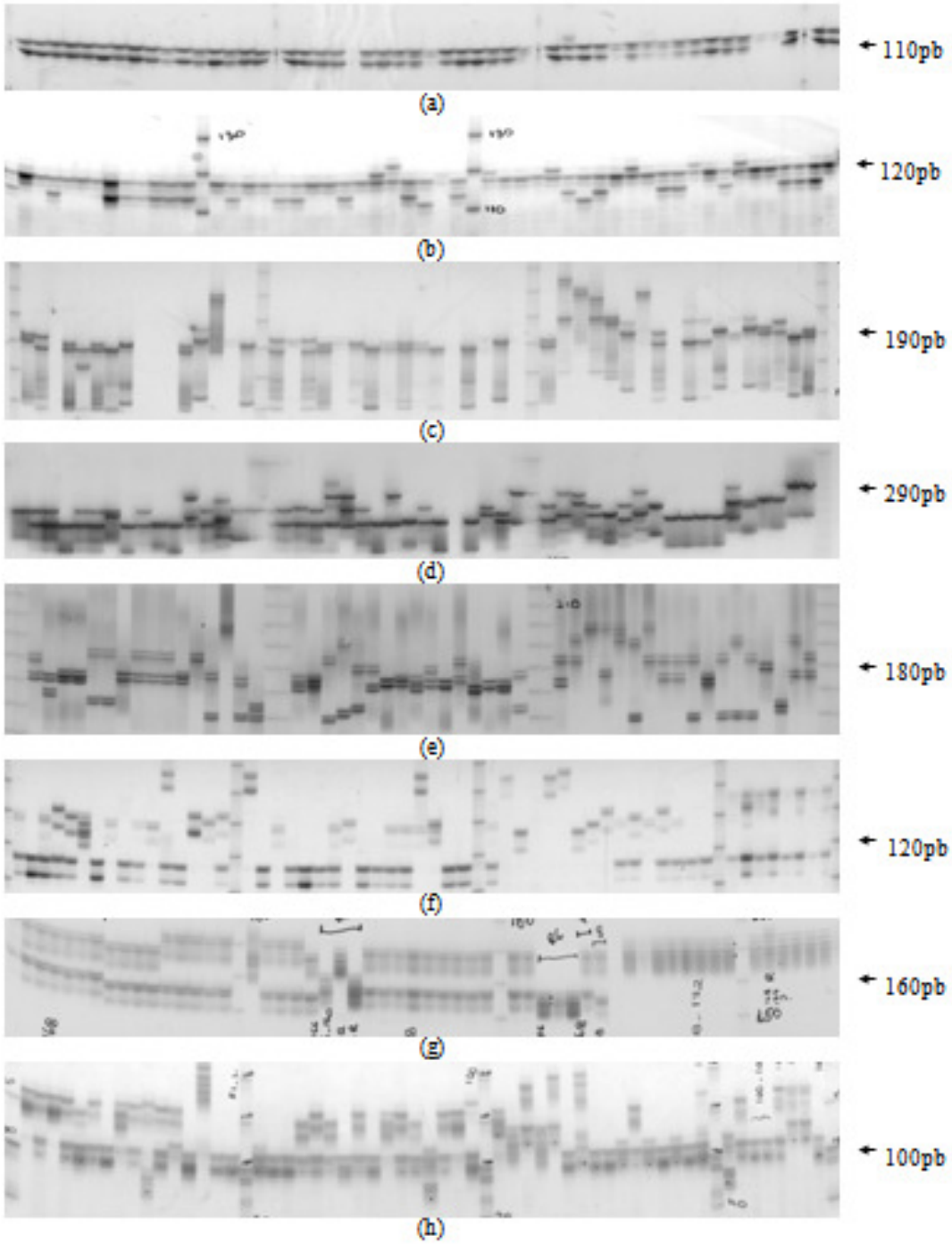

Figura 12 - Perfis de locos microssatélites nucleares transferidos para *H. stigonocarpa*. Estão representados: (a) loco monomórfico HC33, (b) loco HC17, (c) loco HC34, (d) loco HC35, (e) loco HC40, (f) loco HC42, (g) loco HC48 e (h) loco HC49. Géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata. Tamanho dos fragmentos em pares de base indicado à direita

5.3 Transfereabilidade e amplificação dos locos microssatélites cloroplastidiais

Dos cinco iniciadores cloroplastidiais, desenvolvidos para angiospermas dicotiledôneas (ccmp2, ccmp3, ccmp5, ccmp7, ccmp10) (WEISING; GARDNER, 1999) (Tabela 6) e testados em indivíduos de *H. stigonocarpa*, todos amplificaram. Na população da EEI constatou-se a existência de um único haplótipo em todos os locos analisados (Figura 13a-e).

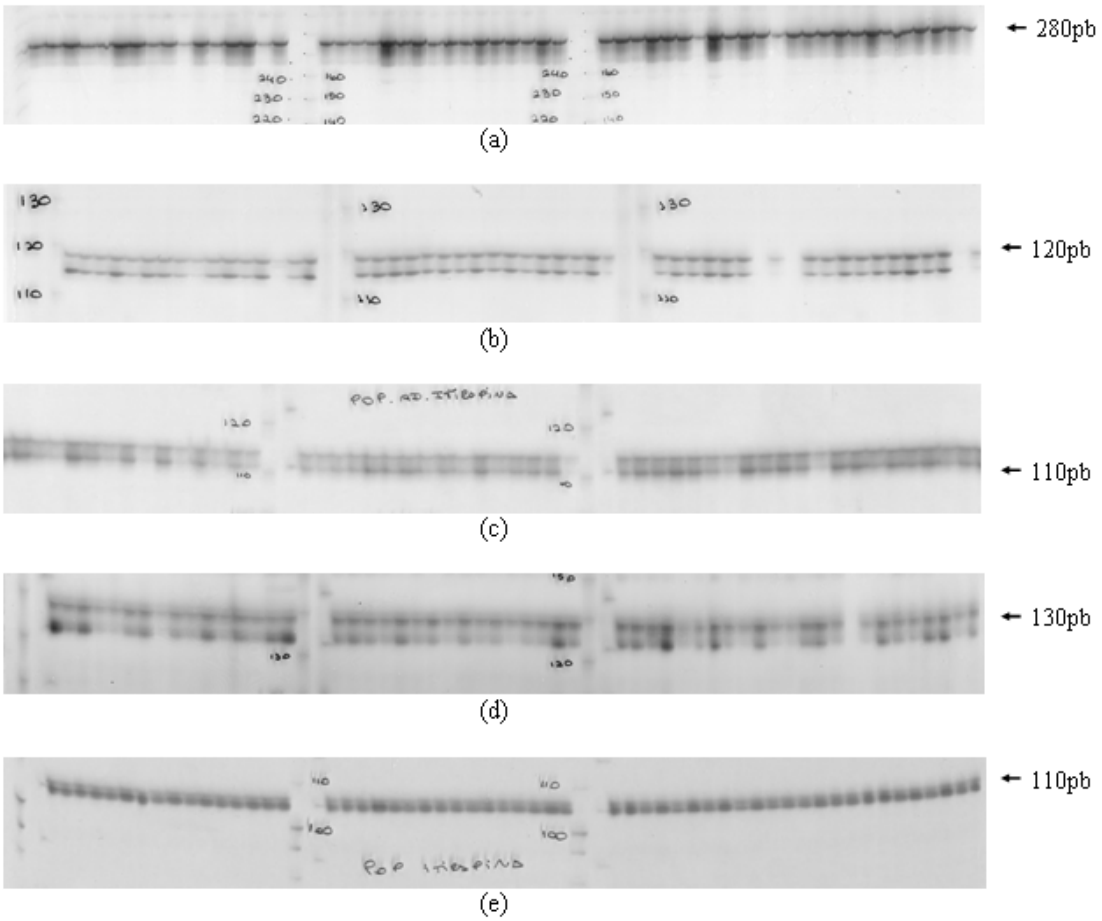

Figura 13 - Perfis de géis de microssatélites cloropastidiais transferidos e utilizados nas análises de *H. stigonocarpa* da população da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP. Estão representados os locos monomórficos: (a) loco ccmp2, (b) loco ccmp3, (c) loco ccmp5, (d) loco ccmp7, (e) loco ccmp10. Géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata; tamanho dos fragmentos em pares de base indicado à direita

Para a população da EEA, dois locos mantiveram-se monomórficos (ccmp3 e ccmp10). A maior amplitude alélica observada foi de 280 pares de base, para o loco ccmp2 (Figura 14a); a menor amplitude foi observada para o loco ccmp10 com 106 pares de base (Figura 14e). O número de alelos por loco variou de dois (ccmp5) a quatro (ccmp7) (Tabela 6).

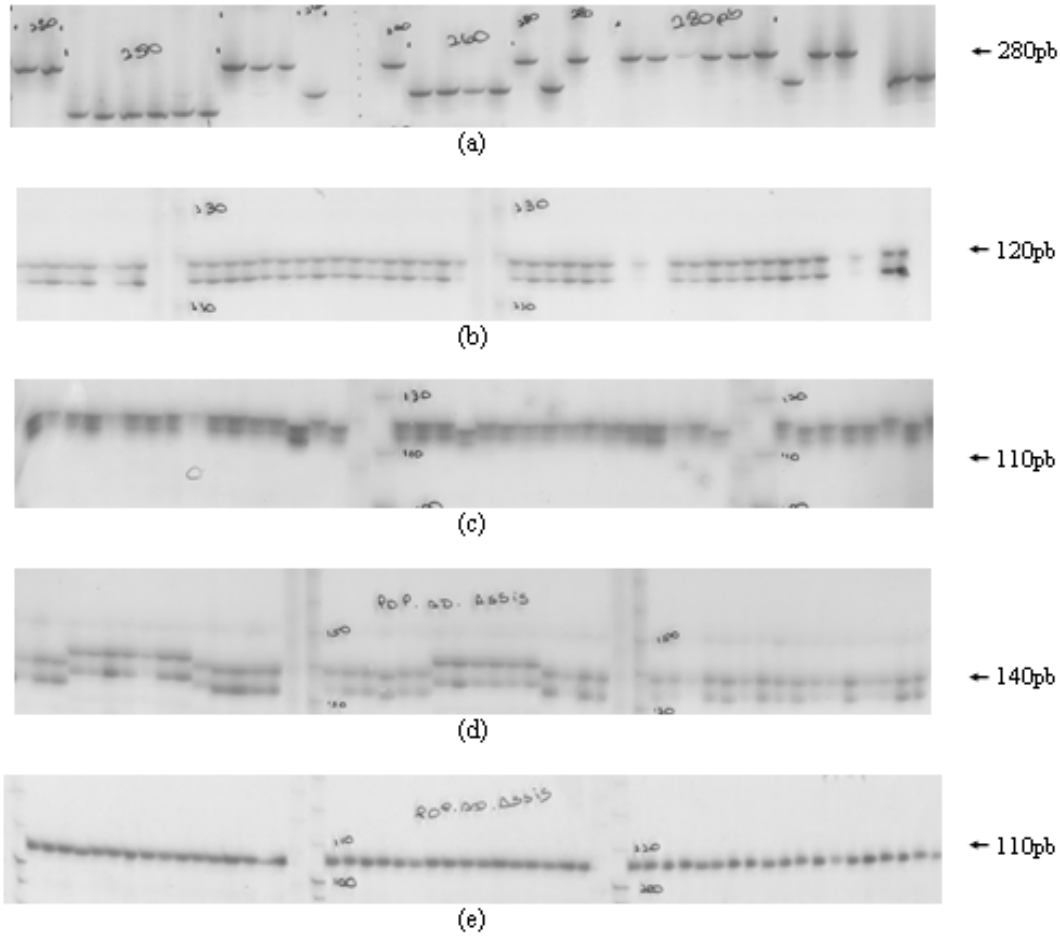

Figura 14 - Perfis de géis de microssatélites cloropastidiais transferidos e utilizados para análises de *H. stigonocarpa* da população da Estação Ecológica de Assis, Assis-SP. Estão representados os locos: (a) loco ccmp2, (b) loco ccmp3, (c) loco ccmp5, (d) loco ccmp7, (e) loco ccmp10. Géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata.Tamanho dos fragmentos em pares de base indicado à direita

Tabela 6 - Locos de microssatélites cloroplastidiais com as respectivas temperaturas de hibridação (Tm), seqüência dos iniciadores, motivo, amplitudes alélicas em pares de base, número de alelos para a população da EEA, Assis, SP

Locos	T_m (°C)	Seqüência dos iniciadores (5'-3')	Motivo*	Alelos	Amplitude alélica (pb)
ccmp02	58	GATCCCggACgTAATCCTg ATCgTACCgAgggTTCgAAT	$(A)_{11}$	3	250-280
ccmp03	54	CAgACCAAAAgCTgACATAg gTTTCATTCggCTCCTTTAT	$(T)_{11}$	1	108-122
ccmp05	54	TgTTCCAATATCTTCTTgTCATTT AggTTCCATCggAACAATTAT	$(C)_7(T)_{10}$ $(T)_5C(A)_{11}$	2	114-116
ccmp07	56	CAACATATACCACTgTCAAg ACATCATTATTgTATACTCTTTC	$(A)_{13}$	4	138-142
ccmp10	56	TTTTTTTTTAgTgAACgTgTCA TTCgTCgDCgTAgTAAATAg	$(T)_{14}$	1	106-112

* Motivo observado por Weising e Gardner (1999) em *Nicotiana tabacum*

5.4 Caracterização dos locos microssatélites nucleares transferidos

(A) Estação Ecológica de Itirapina

Para os 68 indivíduos genotipados da EEI foram obtidos 34 alelos (Tabela 7). O polimorfismo foi baixo para todos os locos, inclusive com a fixação do loco HC33; os locos restantes variaram de sete alelos para o loco HC48 a três alelos para o loco HC42, com média de 4,71 alelos por loco polimórfico e o número efetivo de alelos ($\hat{A}_e$) variou de 1,46 a 4,39 alelos por loco polimórfico (Tabela 7). O conteúdo polimórfico informativo (PIC) teve um valor moderado, mas o poder de exclusão combinado dos parentais foi alto, permitindo a utilização de análise de paternidade com pouco erro associado. Seis dos sete locos polimórficos analisados apresentavam-se fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação foi, em média, significativamente negativo ($\hat{f}_i$ = -0,126) (Tabela 7).

Com o polimorfismo dos marcadores SSR e utilizando o método para detecção de clones proposto por Young et al. (2002) ($p_{gen}(F_{IS})$), foi possível se obter um poder de exclusão de identidade clonal de 99,99%; desta forma, foi possível detectar com precisão os clones na

população da EEI. Dos 68 indivíduos presentes na população da EEI, foram detectados apenas 18 genótipos diferentes (genetes) e 50 rametes.

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**	**A_e**	**H_o**	**H_e**	**PIC**	**$P(Ex_{12})$**	**HW**	**$\hat{f}$ ($IC_{95\%}$)**
HC17	68	5	3,62	0,897	0,724	0,671	0,661	**	-0,242
HC33	68	1	1	0	0	0	0	NC	
HC34	68	5	2,75	0,838	0,637	0,583	0,565	**	-0,32
HC35	68	5	3,90	0,676	0,744	0,693	0,676	**	0,092
HC40	66	5	2,09	0,515	0,521	0,483	0,484	NS	0,012
HC42	68	3	1,46	0,368	0,316	0,287	0,268	**	-0,165
HC48	68	7	4,39	1	0,772	0,734	0,748	**	-0,298
HC49	68	3	1,64	0,323	0,390	0,354	0,444	**	0,171
Média	67,71	4,71	2,42	0,66	0,586	0,544	0,997		-0,126 (-0,123 e -0,132)

N= número de indivíduos amostrados; A= número alelos; A_e= número efetivo de alelos; H_o= heterozigosidade observada; H_e = diversidade gênica; PIC= conteúdo polimórfico informativo; $P(Ex_{12})$= probabilidade de exclusão combinada do pai 1 e 2; HW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; ** = significativo a 0,01; NC= não calculado; NS= não significativo; $\hat{f}$ = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens "bootstrap" sobre locos

O censo realizado, incluindo os clones na população da EEI, gerou uma superamostragem dos indivíduos heterozigotos, expressando um valor superestimado da diversidade gênica e do índice de fixação (Tabela 7).

Nas análises dos locos SSR nucleares transferidos, removendo os clones da população (Tabela 8), houve mudança nas freqüências alélicas, uma redução na diversidade gênica, no número efetivo de alelos, na heterozigosidade observada, no PIC, mas houve aumento no poder de exclusão combinado $P(Ex_{12})$ e principalmente o valor do índice de fixação que ficou próximo de zero, porém significativamente diferente de zero (Tabela 8). Não foi possível efetuar o cálculo para o equilíbrio de Hardy-Weinberg devido ao baixo número de genetes.

Tabela 8 - Descrição dos locos de SSR nucleares para os genetes da população da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP

Locos	N	A	A_e	H_o	H_e	PIC	$P(Ex_{12})$	HW	$\hat{f}$ ($IC_{95\%}$)
HC17	18	5	4,52	0,889	0,779	0,717	0,708	NC	-0,145
HC 33	18	1	1	0,000	0,000	0,000	0,000	NC	-
HC34	18	5	2,71	0,778	0,632	0,565	0,564	NC	-0,240
HC35	18	5	4,63	0,500	0,784	0,726	0,330	NC	0,369
HC40	18	5	3,10	0,667	0,678	0,609	0,592	NC	0,017
HC42	18	3	1,69	0,500	0,408	0,350	0,216	NC	-0,233
HC48	18	7	4,74	1,000	0,789	0,734	0,750	NC	-0,277
HC49	18	3	1,71	0,333	0,417	0,370	0,348	NC	0,206
Média	18	4,71	2,27	0,583	0,560	0,509	0,998	-	-0,041 (-0,054 e -0,042)

N= número de indivíduos amostrados; A= número alelos; A_e= número efetivo de alelos; H_o= heterozigosidade observada; H_e= diversidade gênica; PIC= conteúdo polimórfico informativo; $P(Ex_{12})$= probabilidade de exclusão combinada do pai 1 e 2; HW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; ** = significativo a 0,01; NC= não calculado; NS= não significativo; $\hat{f}$ = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens "bootstrap" sobre locos

Para as progênies, o número de alelos teve um pequeno aumento, com 41 alelos totais (Tabela 9). O número de alelos por loco polimórfico também aumentou, variando de quatro para o loco HC49 a sete para o loco HC48, porém o loco HC33 continuou fixado. A média de alelos por loco polimórfico foi 5,71 e a média do número de alelos efetivos foi de 2,35 (Tabela 9).

Para a população da EEI, nove alelos foram exclusivos em comparação aos da EEA (Tabela 11), sendo cinco deles encontrados apenas nas progênies, sugerindo que a área reprodutiva da população pode ser maior do que a amostrada.

Quando comparamos todos os indivíduos da área (genetes e rametes) com apenas os genetes e com as progênies, constata-se diferença significativa entre os índices de fixação. Neste sentido, observa-se um claro aumento do índice de fixação entre genetes e as progênies, assim como entre o conjunto de genetes e rametes em comparação com apenas os genetes.

Tabela 9 - Descrição dos locos de SSR nucleares para as progênies da população da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP

Locos	**N**	**A**	**A_e**	**H_o**	**H_e**	**$\hat{f}$ ($IC_{95\%}$)**
HC17	70	5	2,09	0,686	0,521	-0,319
HC33	70	1	1	0	0	0
HC34	71	6	2,02	0,634	0,505	-0,257
HC35	70	6	4,08	0,400	0,755	0,472
HC40	63	6	2,56	0,460	0,61	0,247
HC42	71	6	3,58	0,873	0,721	-0,214
HC48	70	7	3,57	0,843	0,720	-0,173
HC49	71	4	1,24	0,211	0,197	-0,075
Média	69,43	5,71	2,35	0,587	0,575	-0,02 (-0,021 e -0,038)

N= número de indivíduos amostrados; A= número alelos; A_e= número efetivo de alelos; H_o= heterozigosidade observada; H_e= diversidade gênica; $\hat{f}$ = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens "bootstrap" sobre locos

(B) Estação Ecológica de Assis

Para a população da EEA foram analisados 47 indivíduos com os mesmos marcadores SSR nucleares utilizados para a população da EEI. O número de alelos obtidos foi significativamente maior do que o encontrado para a população da EEI, obtendo-se um total de 76 alelos (Tabela 10). Destes 76 alelos da população da EEA, foram encontrados 39 alelos exclusivos e 23 alelos que apresentavam freqüência abaixo de 0,05 (5%) (Tabela 11).

O polimorfismo foi significativamente maior nesta população, para todos os locos, com exceção do loco HC33 que permaneceu monomórfico. O número de alelos variou de oito para os locos HC42 a 14 para o loco HC40, com média de 10,71 alelos por loco polimórfico (Tabela 10). O número efetivo de alelos variou de 3,38 a 8,26 por loco (Tabela 10).

Tabela 10 - Descrição dos locos de SSR nucleares para os indivíduos adultos da população da Estação Ecológica e Floresta Estadual de Assis, Assis-SP

Locos	N	A	A_e	H_o	H_e	PIC	$P(Ex_{12})$	HW	$\hat{f}$ $(IC_{95\%})$
HC17	47	9	3,38	0,745	0,704	0,663	0,683	NS	-0,059
HC33	47	1	1	0	0	0	0	NC	
HC34	47	12	4,67	0,787	0,786	0,746	0,772	NS	-0,002
HC35	46	9	3,56	0,587	0,719	0,667	0,662	**	0,186
HC40	46	14	7,63	0,826	0,869	0,851	0,898	NC	0,049
HC42	46	8	3,88	0,413	0,742	0,701	0,722	**	0,446
HC48	39	12	8,26	0,436	0,879	0,868	0,911	NC	0,508
HC49	47	11	3,65	0,681	0,726	0,685	0,709	NS	0,062
Média	45,63	10,71	4,63	0,627	0,784	0,648	0,999		0,177 (0,167 e 0,177)

N= número de indivíduos amostrados; A= número alelos; A_e= número efetivo de alelos; H_o= heterozigosidade observada; H_e= diversidade gênica; PIC= conteúdo polimórfico informativo; $P(Ex_{12})$= probabilidade de exclusão combinada do pai 1 e 2; HW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; ** = significativo a 0,01; NC = não calculado; NS= não significativo; $\hat{f}$ = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens "bootstrap" sobre locos

A heterozigosidade observada variou de 0,413 (HC42) a 0,826 (HC40), com média de 0,627. A heterozigosidade esperada variou de 0,704 (HC17) a 0,879 (HC48) com média de 0,784 (Tabela 10). O conteúdo polimórfico informativo (PIC) teve um valor moderado, mas o poder de exclusão combinado dos parentais foi muito alto, permitindo a utilização de análise de paternidade com maior precisão quando comparada à população da EEI. Apenas dois dos sete locos polimórficos analisados apresentavam-se fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação para indivíduos presentes na área amostrada da população da EEA foi em média significativamente positivo ($\hat{f}_i$ = 0,177) (Tabela 10). Não foi observado nenhum indício de propagação clonal na população da EEA, desta forma esta população é composta por 47 genótipos diferentes (genetes).

Tabela 11 - Freqüência alélica observada em cada loco nas populações de *H. stigonocarpa* de Assis, SP (indivíduos adultos) e de Itirapina, SP (genetes e rametes; genetes e progênies) (Continua)

Locos	Alelos	Assis	Itirapina		
		Adultos	Genetes e Rametes	Genetes	Progênies
HC17	112	0,489	0,059	0,056	0,014
	114	0,170	0,338	0,306	0,179
	116	0,011	0,368	0,278	0,657
	118	0,106	0,096	0,139	0,136
	120	0,021	-	-	-
	122	-	0,140	0,222	0,014
	124	0,149	-	-	-
	128	0,011	-	-	-
	140	0,011	-	-	-
	152	0,032	-	-	-
HC33	114	1	1	1	1
HC34	182	0,011	-	-	-
	188	0,351	-	-	-
	192	0,266	0,537	0,556	0,676
	194	0,128	0,015	0,028	0,014
	196	0,032	0,059	0,083	0,021
	198	0,096	0,184	0,25	0,014
	200	0,032	-	-	-
	202	-	-	-	0,099
	204	-	0,206	0,083	0,176
	206	0,021	-	-	-
	208	0,043	-	-	-
	210	0,011	-	-	-
	214	0,011	-	-	-
HC35	268	0,413	-	-	-
	274	0,054	-	-	-
	276	0,054	0,294	0,194	0,136
	278	0,011	0,029	0,111	0,136
	280	0,315	0,338	0,361	0,150
	282	0,011	0,213	0,139	0,157
	290	0,022	-	-	0,014
	292	0,109	0,125	0,194	0,407
	294	0,011	-	-	-

Tabela 11 - Freqüência alélica observada em cada loco nas populações de *H. stigonocarpa* de Assis, SP (indivíduos adultos) e de Itirapina, SP (genetes e rametes; genetes e progênies) (Continuação)

Locos	Alelos	Assis	Itirapina		
		Adultos	Genetes e Rametes	Genetes	Progênies
HC40	116	0,011	-	-	-
	158	0,085	0,110	0,222	0,317
	160	0,011	0,184	0,194	0,024
	164	0,032	0,676	0,500	0,532
	170	0,117	-	-	-
	172	0,255	-	-	-
	174	0,074	-	-	-
	176	0,032	0,030	0,056	-
	178	0,064	-	-	0,016
	182	0,181	-	-	-
	184	-	-	-	0,008
	190	0,043	-	-	-
	192	0,021	-	-	-
	194	-	0,038	0,194	0,103
	196	0,032	-	-	-
	198	0,043	-	-	-
HC42	112	-	-	-	0,099
	116	0,435	0,816	0,750	0,430
	128	0,207	-	-	-
	130	0,152	-	-	-
	132	0,043	0,051	0,056	0,261
	134	0,033	-	-	0,141
	136	0,022	0,132	0,194	0,028
	144	-	-	-	0,042
	146	0,087	-	-	-
	148	0,022	-	-	-
HC48	144	0,141	-	-	-
	150	-	-	-	0,200
	152	-	0,015	0,028	-
	154	0,051	0,125	0,139	0,086
	156	0,218	0,176	0,250	0,400
	158	0,103	-	-	-
	160	0,103	-	-	0,014
	164	0,141	0,213	0,111	-
	166	0,013	0,037	0,028	0,014
	168	0,038	0,368	0,361	0,279
	170	0,064	0,066	0,083	0,007
	174	0,090	-	-	-
	178	0,013	-	-	-
	184	0,026	-	-	-

Tabela 11 - Freqüência alélica observada em cada loco nas populações de *H. stigonocarpa* de Assis, SP (indivíduos adultos) e de Itirapina, SP (genetes e rametes; genetes e progênies) (Conclusão)

Locos	Alelos	Assis	Itirapina		
		Adultos	Genetes e Rametes	Genetes	Progênies
HC49	94	0,032	-	-	-
	98	0,457	-	-	-
	100	0,106	0,765	0,750	0,894
	104	0,021	0,132	0,111	0,063
	106	0,096	-	-	-
	108	0,223	-	-	-
	110	0,011	-	-	-
	114	0,011	-	-	-
	116	0,021	-	-	-
	118	0,011	-	-	0,021
	120	0,011	0,103	0,139	0,021
Nº total de alelos		**76**	**34**	**34**	**40**

5.5 Diversidade e heterogeneidade clonal

A diversidade clonal (*DC*) ou a proporção de genetes existentes e encontradas na população da EEI foi de 0,254. A heterogeneidade clonal (*D**) para esta população ou a maneira como está distribuída esta diversidade pelas linhagens clonais foi de 0,886, com *D** máximo de 0,944. Por sua vez, na população da EEA não foi encontrado nenhum indivíduo originado por propagação assexuada, a diversidade clonal (*DC*) para 47 indivíduos amostrados foi de 1 e a heterogeneidade clonal (*D**) foi de 0,979, valor correspondente ao seu *D** máximo.

Em ambas as populações a heterogeneidade clonal foi alta mostrando que os genótipos encontram-se bem distribuídos nos diferentes sítios amostrados dentro das populações. Contudo, na população da EEI apenas 25,4% dos indivíduos amostrados são responsáveis pela existência da diversidade genética na área.

A distância média entre clones foi de 2,96 m, variando de 0,09 a 16,02 m. A Figura 15 demonstra a extensão da propagação vegetativa, ou seja, o número de combinação entre pares de clones alocados em 17 classes de distâncias de 1 m.

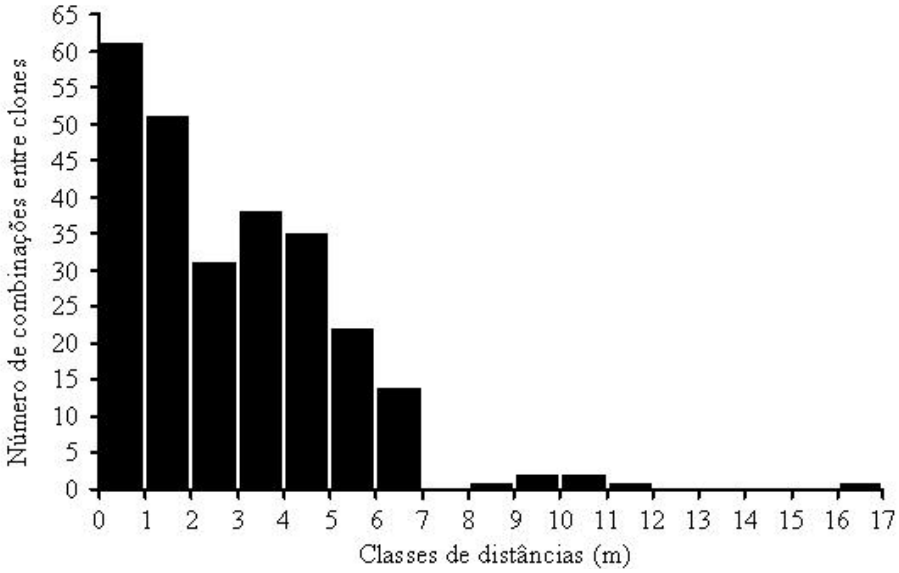

Figura 15 - Número de combinações entre pares de clones alocados em 17 classes de distâncias de 1 m, para os indivíduos de *H. stigonocarpa* da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP

5.6 Detecção de gargalos genéticos

Na população da EEI, para o conjunto de rametes e genetes, não foram detectadas reduções recentes no tamanho efetivo populacional. O Modelo de Passos de Mutação (SMM) e Modelo de Duas Fases (TPM) convergiram para inexistência de gargalos genéticos. Através do modelo SMM detectou-se quatro locos com deficiência de heterozigotos e três com excesso, enquanto o modelo TPM encontrou dois locos com deficiência de heterozigotos e cinco com excesso (Tabela 12).

Tabela 12 - Análise de reduções recentes no tamanho efetivo populacional para o conjunto de genetes e rametes de *H. stigonocarpa*, na Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP, a partir de oito locos SSR

Loco	Observado			TPM		SMM	
	N	k_o	H_e	H_{eq}	*P* -valor	H_{eq}	*P* -valor
HS17	68	5	0,724	0,585	0,091	0,659	0,252
HS33	68	1	-	-	-	-	-
HS34	68	5	0,637	0,573	0,384	0,660	0,319
HS35	68	5	0,744	0,580	0,035	0,666	0,164
HS40	66	5	0,521	0,582	0,252	0,662	0,082
HS42	68	3	0,316	0,376	0,344	0,449	0,180
HS48	68	7	0,772	0,685	0,154	0,762	0,449
HS49	68	3	0,390	0,820	0,454	0,445	0,292

SMM = Modelo de Passos de Mutação; TPM = Modelo de Duas Fases; N = número de indivíduos analisados; k_o = alelos analisados; H_e = heterozigosidade esperada (NEI, 1978); H_{eq} = heterozigosidade esperada no equilíbrio de mutação-deriva

Na população da EEI, analisando-se apenas os genetes, os resultados continuaram apontando para inexistência de reduções recentes no tamanho efetivo populacional. Mesmo com mudanças nas freqüências alélicas, o modelo SMM e o modelo TPM convergiram para a inexistência de gargalos genéticos. O modelo SMM detectou cinco locos com deficiência de heterozigotos e dois com excesso, enquanto o modelo TPM encontrou três locos com deficiência de heterozigotos e quatro com excesso (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise de reduções recentes no tamanho efetivo populacional para genetes de *H. stigonocarpa*, na Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP, a partir de oito locos SSR

Loco	Observado			TPM		SMM	
	N	k_o	H_e	H_{eq}	*P* -valor	H_{eq}	*P* -valor
HS17	18	5	0,779	0,653	0,046	0,702	0,095
HS33	18	1	-	-	-	-	-
HS34	18	5	0,632	0,656	0,330	0,704	0,159
HS35	18	5	0,784	0,646	0,029	0,705	0,086
HS40	18	5	0,678	0,650	0,486	0,703	0,293
HS42	18	3	0,408	0,449	0,360	0,493	0,231
HS48	18	7	0,789	0,762	0,408	0,800	0,328
HS49	18	3	0,417	0,441	0,394	0,494	0,257

SMM = Modelo de Passos de Mutação; TPM = Modelo de Duas Fases; N = número de indivíduos analisados; k_o = alelos analisados; H_e = heterozigosidade esperada (NEI, 1978); H_{eq} = heterozigosidade esperada no equilíbrio de mutação-deriva

Nas progênies da EEI foram detectadas reduções recentes no tamanho efetivo populacional com o modelo SMM. Desta forma, através do modelo SMM foram detectados cinco locos com excesso de heterozigotos e dois com deficiência. Com o modelo TPM, encontrou-se quatro locos com deficiência de heterozigotos e três com excesso. Através do teste Wilcoxon, para o total de locos, o modelo SMM foi significativo (p = 0,020), enquanto o modelo TPM não foi significativo (p = 0,289) (Tabela 14).

Na população da EEA foram detectadas reduções recentes no tamanho efetivo populacional com o modelo SMM. Desta forma, através do modelo SMM foram detectados seis locos com excesso de heterozigotos e um com deficiência. Com o modelo TPM, encontrou-se cinco locos com deficiência de heterozigotos e dois com excesso (Tabela 15). Através do teste Wilcoxon para o total de locos, o modelo SMM foi significativo (p = 0,008), enquanto o modelo TPM não foi significativo (p = 0,148).

Tabela 14 - Análise de reduções recentes no tamanho efetivo populacional para progênies de *H. stigonocarpa*, na Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP, a partir de oito locos SSR

Loco	Observado			TPM		SMM	
	N	k_o	H_e	H_{eq}	*P* -valor	H_{eq}	*P* -valor
HS17	70	5	0,521	0,575	0,261	0,661	0,079
HS33	70	1	-	-	-	-	-
HS34	71	6	0,505	0,634	0,139	0,720	0,016
HS35	70	6	0,755	0,643	0,108	0,716	0,327
HS40	63	6	0,610	0,647	0,285	0,723	0,071
HS42	71	6	0,721	0,641	0,255	0,718	0,438
HS48	70	7	0,720	0,691	0,472	0,761	0,184
HS49	71	4	0,197	0,484	0,065	0,581	0,007

SMM = Modelo de Passos de Mutação; TPM = Modelo de Duas Fases; N = número de indivíduos analisados; k_o = alelos analisados; H_e = heterozigosidade esperada (NEI, 1978); H_{eq} = heterozigosidade esperada no equilíbrio de mutação-deriva

Tabela 15 - Análise de reduções recentes no tamanho efetivo populacional para genetes de *H. stigonocarpa*, na Estação Ecológica e Floresta Estadual de Assis, Assis-SP, a partir de oito locos SSR

Loco	Observado			TPM		SMM	
	N	k_o	H_e	H_{eq}	*P* -valor	H_{eq}	*P* -valor
HS17	47	9	0,704	0,777	0,123	0,825	0,009
HS33	47	1	-	-	-	-	-
HS34	47	11	0,786	0,819	0,210	0,862	0,010
HS35	46	9	0,719	0,775	0,177	0,826	0,024
HS40	46	14	0,869	0,866	0,491	0,895	0,127
HS42	46	8	0,742	0,745	0,383	0,801	0,096
HS48	39	12	0,879	0,846	0,113	0,877	0,453
HS49	47	11	0,726	0,820	0,052	0,860	0,003

SMM = Modelo de Passos de Mutação; TPM = Modelo de Duas Fases; N = número de indivíduos analisados; k_o = alelos analisados; H_e = heterozigosidade esperada (NEI, 1978); H_{eq} = heterozigosidade esperada no equilíbrio de mutação-deriva

5.7 Estrutura genética espacial

Na população da EEI foi detectada uma expressiva e significativa estrutura genética espacial (EGE) para o conjunto de genetes e rametes analisados em cinco classes de distância de um metro (Figura 16). A estimativa do coeficiente de coancestria recente demonstra a existência de possíveis irmãos clonais até 1 m de distância ($\hat{\theta}_{xy}$ = 0,35) e irmãos completos até 5 m de distância ($\hat{\theta}_{xy}$ = 0,25). Com a remoção dos rametes, não foi possível se analisar a EGE dos genetes na mesma escala devido à falta de indivíduos. Logo, numa distância de até 5 m, a EGE para genetes é inexistente.

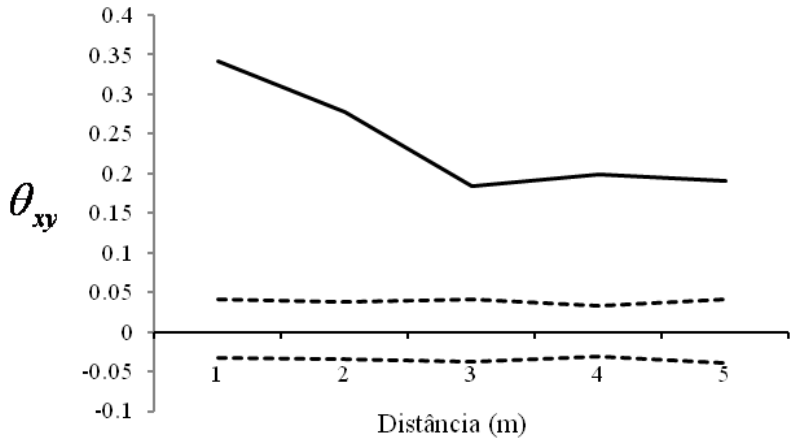

Figura 16 - Correlograma do coeficiente de coancestria recente em cinco classes de distância de 1 m, para indivíduos de *H. stigonocarpa* da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP

Para contornar o problema gerado pela falta de indivíduos, optou-se pela análise da média do coeficiente de coancestria recente entre todos os pares de genetes com o respectivo intervalo de confiança de 95% dado pela média ±1,96*E.P. Para os genetes, o $\hat{\theta}_{xy}$ médio foi de 0,118 (0,087-0,149) com os indivíduos relacionados no grau de meios irmãos (0,125), contrastando com o $\hat{\theta}_{xy}$ médio do conjunto de genetes e rametes que foi de 0,171 (0,163-0,179), valor significativamente maior do que os dos genetes.

Para a população da EEA, a estrutura genética espacial foi significativa até 750 m de distância, com indivíduos relacionados no grau de primos ($\hat{\theta}_{xy}$ = 0,075) (Figura 17). A análise da

média do coeficiente de coancestria recente entre todos os pares de genetes com o respectivo intervalo de confiança de 95% foi de 0,103 (0,095-0,111).

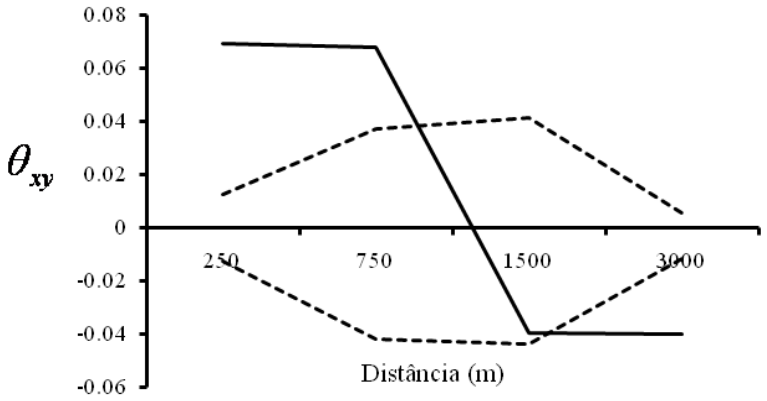

Figura 17 - Correlograma do coeficiente de coancestria recente em nove classes de distância de 300 m, para indivíduos de *H. stigonocarpa* da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-SP

5.8 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund

A população da EEI tanto para o conjunto de genetes e rametes, como para genetes, apresentou índices de fixação negativos, não havendo como corrigir estes índices pela inexistência de endogamia. Outro resultado foi a inexistência de estrutura genética espacial para os genetes da EEI. Por outro lado, a população da EEA apresentou um elevado índice de fixação (f_i = 0,177) e EGE (θ_{xy}=0,075). Desta forma, o novo índice de fixação corrigido (f_n), foi de 0,110, demonstrando que 35% do valor do índice de fixação era devido ao efeito Wahlund.

5.9 Tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação

Os tamanhos efetivos populacionais ($\hat{N}_e$) para *H. stigonocarpa* nas populações da EEI e da EEA estimados com base em Crossa e Vencovsky (1999), $N_e = \frac{N}{1+\hat{f}}$, foi de 68 para genetes e rametes da EEI, 18 para os genetes da EEI e 40 para a EEA. Como não há endogamia na população da EEI, o $\hat{N}_e$ foi igual ao *N* (número de indivíduos encontrados), demonstrando que a

amostragem de rametes na população ocasionou um valor superestimado do tamanho efetivo. Na população da EEA houve uma redução de 14,9% no tamanho efetivo devido ao elevado valor do $\hat{f}$.

Utilizando-se estes tamanhos efetivos estimados com base em Crossa e Vencovsky (1999), a área mínima viável ($A\hat{M}V$) para conservação genética *in situ* para EEA e para EEI encontram-se na Tabela 16. Independente do tamanho efetivo de referência, a $A\hat{M}V$ da EEI foi subestimada quando comparado o conjunto de genetes e rametes com apenas os genetes, devido a uma superestimativa na densidade e $\hat{N}_e$ do conjunto de genetes e rametes.

Tabela 16 - Estimativas da área mínima viável (AMV) para conservação genética *in situ* para EEA e para EEI, SP

População	n	$\hat{N}_e$	d	**AE (ha)**	**AMV_{1000} (ha)**	**AMV_{500} (ha)**	**AMV_{50} (ha)**
Itirapina							
Genetes e rametes	68	68	0,100	2.300	10.000	5.000	500
Genetes	18	18	0,027	2.300	37.037	18.519	1.852
Assis							
Genetes	47	40	0,100	4.480	11.764	5.882	588

n : tamanho amostral; $\hat{N}_e$: Tamanho efetivo populacional; d : densidade populacional em plantas por ha; AE : área atual estimada de cada fragmento; AMV_{1000}: área necessária para reter $N_{e(ref)}$ = 1000; AMV_{500}: área necessária para reter $N_{e(ref)}$ = 500; AMV_{50}: área necessária para reter $N_{e(ref)}$ = 50, com base em Crossa e Vencovsky (1999)

Como existe coancestria entre indivíduos dentro das populações da EEI e da EEA, calculou-se também o tamanho efetivo populacional utilizando-se como base a expressão apresentada por em Sebbenn e Seoane (2005): $\hat{N}_e = \frac{0{,}5n^2}{(1+\hat{f})\left(0{,}5n + \sum_{x=1}^{n}\sum_{y\neq 1}^{n}\hat{\theta}_{xy}\right)}$ Os valores obtidos foram de 12 para o conjunto de genetes e rametes para a EEI, 10 para os genetes da EEI e 14 para a EEA. A partir destes tamanhos efetivos e considerando o coeficiente de coancestria recente, a área mínima viável ($A\hat{M}V$) para conservação genética *in situ* para EEA e para EEI encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 - Estimativas da área mínima viável (AMV) para conservação genética *in situ* para EEA e para EEI, SP

População	n	$\hat{N}_e$	d	**AE (ha)**	**AMV_{1000} (ha)**	**AMV_{500} (ha)**	**AMV_{50} (ha)**
Itirapina							
Genetes e rametes	68	12	0,100	2.300	56.818	28.409	2.841
Genetes	18	10	0,027	2.300	66.667	33.333	3.333
Assis							
Genetes	47	14	0,100	4.480	33.670	16.835	1.684

n : tamanho amostral; $\hat{N}_e$: Tamanho efetivo populacional; d : densidade populacional em plantas por ha; AE: área atual estimada de cada fragmento; AMV_{1000}: área necessária para reter $N_{e(ref)}$ = 1000; AMV_{500}: área necessária para reter $N_{e(ref)}$ = 500; AMV_{50}: área necessária para reter $N_{e(ref)}$ = 50, considerando o coeficiente de coancestria, de acordo com Sebbenn e Seoane (2005)

5.10 Fluxo gênico contemporâneo

Após a discriminação clonal, constatou-se que quatro indivíduos dos quais foram coletados frutos (adultos 1, 4, 5 e 6) pertencem a um único genete, indivíduo 1 da reboleira 1 que produziu um total de 68 sementes, as outras três sementes analisadas foram do adulto 10 que se encontrava isolado. Das 71 sementes coletadas diretamente das matrizes e analisadas, 41 (57,54%) tiveram doadores de pólen presentes na área amostrada e 6 (8,50%) foram geradas por autofecundação. Dos 18 genetes presentes na área, 13 (72%) contribuíram com pólen. Houve dominância de doadores de pólen produzindo em média 3 filhos por matriz, variando de 1 a 11 filhos. A distância média de polinização foi de 2.325 m variando de 0,35 m a 3.570 m. O maior número de encontros entre uma única matriz e um único doador de pólen foram 11 com 3.570 m de distância. O tamanho efetivo de vizinhança de polinização foi de 1.283 ha.

Devido ao baixo poder de exclusão relacionado apenas com o primeiro parental (80%) ou com o segundo parental (94%), as sementes que se encontravam depositadas no chão do ponto de coleta 1 (reboleira) não foram analisadas devido ao grande erro associado com a análise de paternidade.

5.11 Fluxo gênico realizado

Todos os estimadores utilizados apresentaram alta e significativa divergência genética e um fluxo gênico realizado quase inexistente entre a população da EEI e da EEA (Tabelas 18 e 19). Todos os estimadores utilizados também apresentaram um aumento na divergência genética quando clones estavam inseridos na população da EEI e desta forma o fluxo gênico realizado ficou ainda mais reduzido. O valor do G_{ST}' foi o maior entre os estimadores utilizados e também o que apresentou maior oscilação quando foram realizadas as análises entre populações com e sem clones. O valor do R_{ST} foi o segundo maior entre os estimadores utilizados e apresentou a menor oscilação quando foram realizadas as análises entre populações com e sem clones.

Tabela 18- Divergência genética e fluxo gênico realizado entre EEI (genetes) e EEA

	F_{ST}	θ_p	G_{ST}	G'_{ST}	R_{ST}
	0,283	0,283	0,171	0,446	0,327
Nm	0,158	0,158	0,303	0,078	0,129

Tabela 19 - Divergência genética e fluxo gênico realizado entre EEI (rametes e genetes) e EEA

	F_{ST}	θ_p	G_{ST}	G'_{ST}	R_{ST}
	0,327	0,327	0,191	0,755	0,332
Nm	0,129	0,129	0,265	0,020	0,126

5.12 Diversidade de marcadores cloroplastidiais

Para os cinco pares de marcadores cpDNA a população da EEI apresentou a amplificação de um único fragmento e conseqüentemente obteve-se um único haplótipo, demonstrando que foi fundada por uma única linhagem materna. A população da EEA apresentou a amplificação de onze fragmentos e houve a formação de seis haplótipos ($\hat{n}_h$ = 6) com uma diversidade

haplotípica ($\hat{h}$ = 0,667±0,094) moderada (Tabela 20), demonstrando que a da EEA foi fundada por um número pequeno de linhagens maternas. Foram encontrados cinco haplótipos privados na população da EEA. O número efetivo de haplótipos ($\hat{n}_e$ = 2,965) foi praticamente metade do número total de haplótipos (Tabela 20). A heterogeneidade das freqüências dos haplótipos foi que contribuiu para a baixa estimativa do $\hat{n}_e$ (Figura 18).

Tabela 20 - Estimativa de parâmetros de diversidade genética para haplótipos cloroplastidiais

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

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

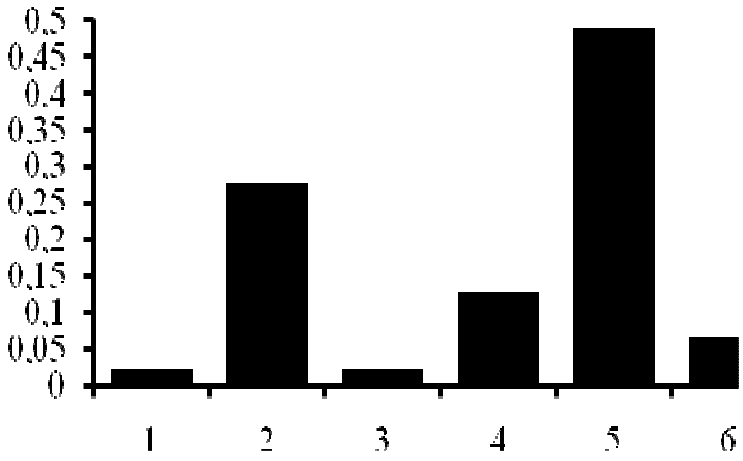

Figura 18 - Freqüências dos diferentes haplótipos da população da EEA, Assis-SP

A análise de estrutura genética espacial dos haplótipos na população EEA utilizando o *I* de Moran revelou que a maior concentração de haplótipos semelhantes encontra-se num raio de 25 m e esta semelhança tende a diminuir gradualmente até os 75 m, com a completa ausência de EGE aos 100 m (Figura 19). Numa escala menos refinada, com classes de distância de 250, 750, 1500 e 3000 m, o índice demonstra que o limite da EGE obteve valor máximo de um e foi aos 750 m (Figura 20).

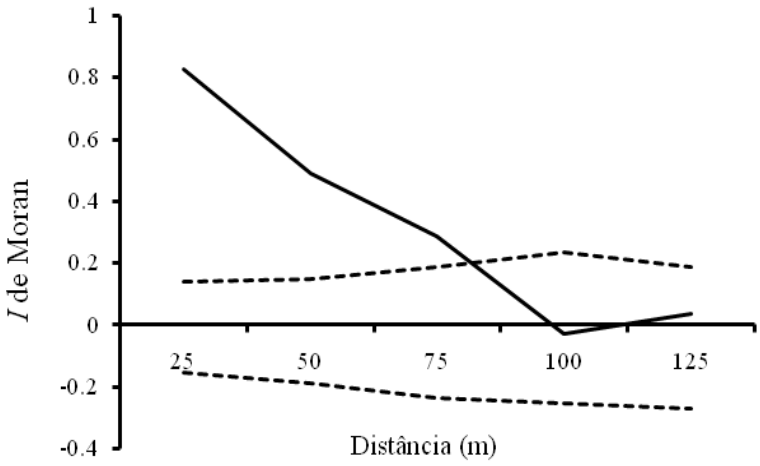

Figura 19 - Correlograma do *I* de Moran pela distância dos haplótipos na Estação Ecológica de Assis, Assis-SP

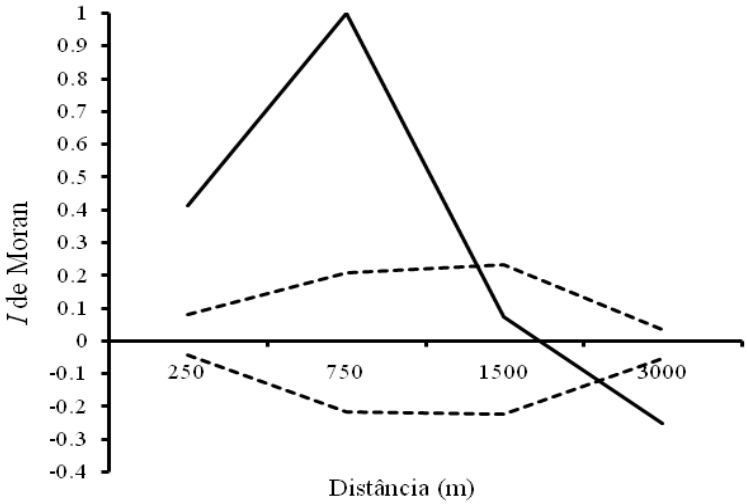

Figura 20 - Correlograma do *I* de Moran pela distância dos haplótipos na Estação Ecológica de Assis, Assis-SP

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos demográficos

As áreas do presente estudo representam dois padrões fitogeográficos distintos de remanescentes de Cerrado no Estado de São Paulo. A Estação Ecológica de Assis (EEA), situada ao leste do Estado, apresenta uma fisionomia de cerradão e ecótono entre Cerrado e Floresta Estacional Semidecidual. Por sua vez, a Estação Ecológica de Itirapina (EEA), situada ao limite oeste do Cerrado no Estado, apresenta a fisionomia de cerrado aberto. Nessas duas áreas os indivíduos da espécie em estudo encontravam-se agregados e a distribuição dos conjuntos desses indivíduos (pontos) ocorreu de maneira aleatória na EEI e uniforme na EEA. Segundo Durigan et al. (2003), os padrões de distribuição em grandes escalas, neste caso referindo-se a distribuição espacial dos pontos, podem estar relacionados a fatores como fertilidade dos solos e condições climáticas. Sendo assim, a distribuição não agregada dos pontos pelas áreas da EEA e da EEI sugere não haver um diferencial para germinação ou estabelecimento de plântulas de acordo com o tipo de solo. Tendo em vista que a EEI é na sua maior parte composta por Neossolos arenosos bem drenados (SILVA, 2005), e a EEA é composta por dois tipos de solo que apresentam características similares de baixa fertilidade e com pouca retenção hídrica, essa aparente homogeneidade de solos, nas duas áreas, não conduziu a uma distribuição agregada dos pontos.

Contrariamente aos resultados obtidos para os pontos, em ambas as áreas a distribuição espacial dos indivíduos de *H. stigonocarpa* ocorreu de maneira agregada. Esse resultado corrobora com outros estudos realizados em formações savânicas, inclusive no Cerrado brasileiro, onde a maioria das espécies apresentou uma distribuição espacial agregada (LIMA-RIBEIRO; PRADO, 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, fatores edáficos ou ainda por propagação vegetativa. Com a utilização de marcadores microssatélites, nucleares e cloroplastidiais, e com a análise da estrutura genética espacial foi possível apontar que a dispersão restrita de sementes foi a principal responsável pela agregação de indivíduos na EEA e na EEI.

Numa escala ainda mais refinada, utilizando apenas marcadores microssatélites nucleares, descobriu-se ainda que a alta agregação de indivíduos na EEI foi devida principalmente à propagação vegetativa, na qual dos 68 indivíduos analisados apenas 18 eram genetes. Segundo

Bulhão e Figueiredo (2002), a propagação vegetativa ocorre em poucas espécies leguminosas que exibem raízes diagravitrópicas que crescem paralelamente à superfície do solo, como no caso de *H. stigonocarpa*. Appezzato-Da-Glória[1] (comunicação pessoal), utilizando técnicas de escavação realizadas na EEI, com os mesmos indivíduos de *H. stigonocarpa* do presente estudo, observou que indivíduos dentro das reboleiras apresentavam-se conectados através de raízes (Figura 21). Assim, a sobrevivência da espécie, aparentemente, além de depender da produção regular de sementes, germinação e estabelecimento de plântulas, tem a vantagem de estabelecer-se por propagação vegetativa.

Figura 21 - Indivíduos de *H. stigonocarpa* com o sistema subterrâneo exposto após a escavação na EEI. Detalhe do sistema subterrâneo espessado, em posição horizontal ao solo, com um ramete originado a partir do sistema subterrâneo. Fonte: Beatriz Appezzato-Da-Glória,2008

A alta agregação de indivíduos devido à propagação vegetativa no Cerrado está, provavelmente, associada ao modo de regeneração dos indivíduos após incêndios ou cortes. Ressalta-se que a maioria das espécies de Cerrado pode regenerar-se facilmente por brotação de estruturas subterrâneas, muitas vezes gerando vários indivíduos geneticamente idênticos, a partir

de um único indivíduo pré-existente (DURIGAN et al., 2002), fato possivelmente ocorrido nos indivíduos de *H. stigonocarpa* da população da EEI.

Lewinsohn (1980) e, Bulhão e Figueiredo (2002) já haviam constatado que *H. stigonocarpa* apresenta brotamento nas raízes nos meses subseqüentes à injúria, evidenciando a propagação vegetativa. Considerando-se o histórico de perturbações ambientais ocorridas na área da EEI, como o registro de ao menos dez incêndios ocorridos entre os anos de 1998 e 2007 (MOTTA-JUNIOR; GRANZINOLLI; DEVELEY, 2008), sendo alguns consecutivos e de grandes proporções, além de severas geadas (MIRANDA-MELO, 2004), acredita-se na hipótese de uma relação direta entre a ocorrência de rebrota de propagação vegetativa, a partir de raízes em indivíduos de *H. stigonocarpa*, à ocorrência destes distúrbios. Mais um indício dessa relação deve-se ao fato de não haver indivíduos clonais na população da EEA, protegida da ação do fogo desde a sua criação em 1962.

Outras questões relacionadas entre a propagação vegetativa que ocorre na EEI e a sua não ocorrência na EEA são as diferentes formas fisionômicas de Cerrado que refletem em diferentes composições de material combustível e, conseqüentemente, no regime de queimadas. Na fisionomia de campo cerrado, da EEI, o material combustível corresponde às espécies de gramíneas, que secam facilmente ao sol e no período de seca. No entanto, no cerradão, fisionomia típica da EEA, as copas das árvores proporcionam um microclima desfavorável ao fogo, uma vez que o aumento das espécies lenhosas aumenta a cobertura do solo, o que reduz o risco de incêndio (MIRANDA; BUSTAMANTE; MIRANDA, 2002; EITEN; SAMBUICHI, 1996). Desta maneira, o fogo tem um importante efeito na demografia de plantas lenhosas do Cerrado através do seu impacto na sobrevivência, no crescimento e na morte de biomassa aérea (HOFFMANN; SOLBRIG, 2003). Esse tipo de perturbação reduz a dominância de plantas estabelecidas, aumenta o estabelecimento e crescimento de plântulas, diminui a taxa de recrutamento, aumenta a mortalidade de plantas juvenis (HOFFMANN, 1998) e provoca maior perda nutricional do solo (COUTINHO, 1990).

As ocorrências de fogo e fortes geadas na área da EEI podem ter ocasionado a redução ou a morte da parte aérea dos indivíduos, influenciando no porte reduzido e homogêneo de altura e de diâmetro desses, quando comparados aos da população da EEA, com valores significativamente maiores e heterogêneos. Considerando que a ocorrência de fogo eventual tem sido referida como normal, principalmente no cerrado típico, pode-se considerar estes resultados

obtidos como passivelmente extrapoláveis para outros locais. Em tema, merece melhor investigação e aprofundamento. Além disso, os tamanhos máximos para altura e CAB dos indivíduos da EEI foram muito menores daqueles encontrados para a média da espécie (CARVALHO, 2007). Resultados similares foram encontrados na EEI para *Caryocar brasiliense* e *Diospyros híspida* (IBAÑES et al., 2008). Esses resultados estão provavelmente relacionados com restrições edáficas encontradas na EEI, que é formada por Neossolos arenosos, nutricionalmente pobres (SILVA, 2005).

Apesar de desconhecer a natureza de ligação dos marcadores moleculares com as características fenotípicas, não se pode descartar a hipótese que a baixa diversidade genética e a presença de um único haplótipo tenham influenciado no porte homogêneo dos indivíduos da EEI, ao contrário da EEA onde os indivíduos apresentaram heterogeneidade no porte, possivelmente associado com uma alta diversidade genética e haplotípica.

6.2 Transferibilidade dos locos microssatélites e propagação vegetativa

Ao comparar a média de alelos por loco (EEI, adultos = 4,71 e progênies = 5,71 e EEA = 10,71) com outros trabalhos desenvolvidos em *Hymenaea courbaril*, ou seja, com a espécie para a qual os marcadores microssatélites nucleares foram desenvolvidos, Toledo (2005), Castellen (2005) e Guidugli (2007) obtiveram uma média de alelos de 6,38, 9,50 e 9,32, respectivamente. Desta forma, nota-se que a transferibilidade dos locos para *H. stigonocarpa* não reduziu o número de alelos por loco, efeito comum causado pela transferência de locos microssatélites (SANTOS et al., 2007). Os locos microssatélites nucleares utilizados no presente estudo mostraram-se eficientes para avaliar a diversidade genética das populações, a detecção de clones, assim como para se avaliar o fluxo gênico contemporâneo baseado em análise de paternidade.

O sucesso da transferência dos locos microssatélites e o auxílio do programa computacional GenClone para espécies clonais foram fundamentais para avaliar a ocorrência de clones nas populações de *H. stigonocarpa.* Foi possível observar um poder de exclusão para identidade clonal de 99,99% e, desta forma, detectou-se com precisão a presença de clones na população da EEI. Os resultados constataram que dos 68 indivíduos da população da EEI, apenas 18 genótipos foram geneticamente diferentes (genetes). Estes avanços metodológicos eliminaram a necessidade de esforços amostrais de campo, uma vez que existe grande dificuldade de se

realizar escavações em maiores distâncias, como por exemplo, a distância máxima encontrada entre pares de clones neste estudo (16,02 m), além de minimizar impactos na vegetação causados pelas escavações.

Os resultados deste estudo corroboram com os descritos por Defavari et al. (2007) e Lewinsohn (1980) que evidenciaram a ocorrência de propagação vegetativa em *H. stigonocarpa* no Estado de São Paulo. Em relação à extensão da propagação vegetativa obtida na EEI, a média foi de 2,96 m, sendo que 97,27 % das combinações entre pares de clones estavam a menos de 6 m. Vale ressaltar que a análise da estrutura genética espacial detectou elevada coancestria em até 5 m de distância, com possíveis irmãos-clonais até 1 m ($\hat{\theta}_{xy}$ = 0,35), classe de distância que alocou a maior quantidade de pares de clones. A detecção de elevada coancestria a curtas distâncias é um possível indício da existência de propagação vegetativa, revelando-se uma análise útil para estudos que abordem a relação de parentesco entre indivíduos, neste caso, de irmãos-clonais.

Um dos aspectos positivos que podem ser relacionados com a propagação vegetativa é a presença de rametes oriundos do sistema subterrâneo que podem conferir eficiência à reprodução de *H. stigonocarpa*. Isto porque os rametes permitem que a espécie colonize localmente a área através de genótipos adaptados (ERIKSSON, 1993), o que parece ser o caso da população da EEI, onde houve predominância de indivíduos heterozigóticos, baixa diversidade clonal e alta heterogeneidade entre pontos. Além dessa característica, também há a possibilidade de maior produção de sementes por genótipo. Essa hipótese é aceitável quando todos os rametes produzem sementes na mesma época reprodutiva, desta forma, competindo vantajosamente pela ocupação de novos habitats.

Entretanto, não se podem descartar os aspectos negativos gerados pela propagação vegetativa. Estudos teóricos (SILVERTOWN, 2008) apontam que clones que atingem a maturidade reprodutiva ocasionam mudanças nos padrões de biologia reprodutiva e, por conseqüência, na diversidade genética das populações. Essas mudanças na diversidade genética podem ser expressas em aumentos na taxa de endogamia, devido ao cruzamento entre aparentados ou às autofecundações entre diferentes rametes de um genete, desde que haja compatibilidade genética.

As autofecundações parecem ser uma das possíveis causas da baixa produção de sementes de *H. stigonocarpa* na EEI, devido ao sistema de auto-incompatibilidade pós-zigótica (GIBBS;

OLIVEIRA; BIANCHI, 1999) que causa abortos de óvulos autopolinizados. Isto porque existe um grande número de rametes potencialmente reprodutivos na área de estudo, em relação a uma menor quantidade de genetes fornecedores de pólen intraespecífico compatível. Contudo, parece não haver atuação de um sistema de auto-incompatibilidade nas populações estudadas de *H. stigognocarpa*, uma vez que o resultado do teste de paternidade demonstrou a presença de 8,5% das sementes originadas por autofecundação, resultado condizente ao encontrado por Moraes, Kageyama e Sebbenn (2007). Porém, para a confirmação desta hipótese de baixa produção de frutos, ocasionada por um sistema de auto-incompatibilidade, seriam necessárias observações diretas do número de flores presentes em cada árvore, do número de plantas polinizadas e do número final de sementes geradas.

6.3 Diversidade genética, estrutura genética espacial e parâmetros afins

Na população da EEI a única estimativa de diversidade genética que não foi influenciada pela presença da propagação vegetativa foi o número de alelos na população. Portanto, o presente estudo corrobora com estudos teóricos, os quais confirmam que: o aumento da assexualidade, quando existem clones heterozigóticos, promove um aumento na heterozigosidade média, e, com isso, vários índices de diversidade genética e outros derivados a partir deles são superestimados (ARNAUD-HAOND; BELKHIR, 2007; BALLOUX; LEHMANN, 2003). Desta forma, todas as discussões comparativas deste estudo foram baseadas nas estimativas de diversidade genética obtidas, desconsiderando os indivíduos clonais, sendo realizadas apenas para os genetes.

O número médio de alelos por loco foi inferior ao obtido por Moraes, Kageyama e Sebbenn (2007) para adultos ($\hat{A}$ = 7,00) e para progênies ($\hat{A}$ = 11,67) em duas populações de *H. stigonocarpa* do Mato Grosso do Sul, e por Ciampi et al. (2008) em populações nos Estados da Bahia e Minas Gerais ($\hat{A}$ = 6,43). O loco HC33 não apresentou variação nas duas populações (EEA e EEI) de *H. stigonocarpa*, mas foi mantido por ter-se apresentado como polimórfico nos trabalhos de Moraes, Kageyama e Sebbenn (2007) e Ciampi et al. (2008).

Para a população da EEI, a heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$ = 0,560) foi inferior à da população da EEA ($\hat{H}_e$ = 0,784) e às daquelas populações estudadas por Moraes, Kageyama e Sebbenn (2007) ($\hat{H}_e$ = 0,633). Por sua vez, o índice de fixação da população da EEI ($\hat{f}$ =-0,041),

foi significativamente negativo, contrastando com os valores positivos e significativos da EEA ($\hat{f}$ = 0,177) e das populações estudadas por Moraes, Kageyama e Sebbenn (2007) ($\hat{f}$ = 0,301). Essa baixa heterozigosidade esperada no modelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, associada a um índice de fixação negativo na população EEI, sugere um recente efeito gargalo ou ainda a possibilidade de um efeito fundador. Um recente efeito gargalo não foi confirmado pela análise gerada pelo programa BOTTLENECK (PIRY et al., 1999), na qual dois dos oito locos polimórficos apresentaram $H_e > H_{eq}$. Segundo Piry et al. (1999), quando $H_e > H_{eq}$ há indícios de que ocorreu deriva devido à redução populacional. Populações que tiveram reduções recentes no tamanho efetivo exibem uma redução do número de alelos e da heterozigosidade nos locos polimórficos. Sendo que a redução no número de alelos ocorre mais rapidamente do que a redução na H_e.

Apesar do programa BOTTLENECK (PIRY et al., 1999) não apontar para a ocorrência de gargalos recentes na população, um efeito fundador deve ter ocorrido nesta população há mais de cinco gerações. Isto porque o limite do modelo para detecção de gargalos pelo programa BOTTLENECK (PIRY et al., 1999) é menor do que cinco gerações. Além disso, os dados de diversidade haplotípica demonstram a existência de um único haplótipo (linhagem materna) para a população e baixa diversidade genética utilizando marcadores nucleares. Ramos et al. (2007), utilizando marcadores cloroplastidiais, revelaram em uma população próxima da EEI a dominância de um único haplótipo (linhagem materna), fato que corrobora com a hipótese para o efeito fundador na EEI: colonização de propágulos gerados por mães com a mesma ascendência.

Os resultados obtidos para a população da EEA, utilizando o programa BOTTLENECK (PIRY et al., 1999), não foram conclusivos, uma vez que houve divergência entre os modelos TPM e SMM. Um número maior de locos, aproximadamente 20, deveria ser utilizado para a obtenção de um resultado conclusivo. Contudo, sugere-se que a população da EEA não tenha passado por gargalos genéticos recentes ou efeito fundador, por apresentar diversidade haplotípica e alto número de alelos com base nos locos microssatélites nucleares.

O índice de fixação, positivo e significativo, obtido para a população da EEA foi ocasionado por uma significativa estrutura genética espacial de até 750 m de distância, que gera o efeito Wahlund. O Efeito Wahlund mede o grau de subdivisão da população como um todo, e tende a reduzir a freqüência de heterozigotos (FUTUYMA, 1992). Resultados similares foram obtidos por Moraes, Kageyam e Sebbenn (2007), que estimaram uma EGE até 500 m de

distância. Segundo esses autores, a EGE aliada a uma alta quantidade de irmãos-completos produzidos por endocruzamentos nas populações ocasiona o alto e significativo índice de fixação. No presente estudo foi possível afirmar que a EGE na população da EEA foi causada por uma dispersão restrita de sementes e não por uma dispersão restrita de pólen, isto porque a EGE também foi avaliada com marcadores cloroplastidiais que se revelou positiva e significativa até 750 m de distância.

Com a estimativa da EGE para população da EEA foi possível corrigir o índice de fixação para separar o efeito Wahlund de uma estimativa mais aproximada com a endogamia gerada pelo sistema reprodutivo. Desta forma, o novo índice de fixação corrigido (f_n) foi de 0,110, demonstrando que 35% do valor do índice foi causado pelo efeito Wahlund. Mesmo assim, o valor foi alto e significativo, indicando que a população analisada pode ter sido originada por endocruzamentos, como demonstrado por Moraes, Kageyama e Sebbenn (2007) para duas populações de *H. stigonocarpa* no Mato Grosso do Sul.

Contrastando com a população da EEA, a da EEI só apresentou uma EGE significativa na presença dos clones. Para os genetes, a EGE foi inexistente devido ao baixo número de indivíduos disponíveis, e por estes encontrarem-se distribuídos aleatoriamente pela EEI. Contudo, a coancestria calculada para os 18 genetes foi alta e significativa, com grau de parentesco aproximado de meios-irmãos. A magnitude da coancestria total calculada foi importante para os cálculos relacionados com tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação de caracteres quantitativos. Pois, desconhecendo-se a coancestria entre indivíduos dentro de uma população, pode-se superestimar o tamanho efetivo e subestimar a área mínima viável (SEBBENN; SEOANE, 2005).

Tanto para a população da EEA quanto para a da EEI, o tamanho efetivo foi insuficiente para manter a endogamia estável em curto prazo, de até dez gerações (FRANKEL; SOULÉ, 1981). O valor baixo do tamanho efetivo deve-se principalmente a uma alta coancestria entre os indivíduos e não necessariamente uma alta endogamia, fato confirmado pela população da EEI, que apresentou ausência de endogamia, mas alta coancestria. A área mínima viável para conservação revelou que as Unidades de Conservação EEI e EEA apresentam área insuficiente para manter uma população mínima viável (médio prazo). Uma das principais razões para as AMVs serem maiores do que as áreas das Estações Ecológicas foi a reduzida densidade de indivíduos por hectare, associada a um baixo tamanho efetivo. Além disso, não se pode descartar

a hipótese de que a raridade dos indivíduos nas populações da EEI e da EEA deva estar relacionada com a localização das áreas, que são próximas ao limite austral do Cerrado e num ambiente desfavorável ao seu desenvolvimento.

6.4 Fluxo gênico contemporâneo via pólen

O cálculo da AMV demonstrou que a EEI e a EEA possuem áreas insuficientes para conservação de *H. stigonocarpa* e o cálculo da área efetiva de vizinhança para polinização na EEI evidenciou que cada árvore matriz utilizou 1283 ha para a polinização, quase a metade do tamanho da EEI. A distância de polinização média encontrada foi de 2325 m, o que demonstra que 44% dos doadores de pólen estão fora da área de estudo (680 ha dentro da EEI). Logo, os possíveis doadores podem estar protegidos na EEI ao redor da área de estudo, mas segundo Tarazi (comunicação pessoal), em estudos no restante da EEI não foram observados indivíduos de *H. stigonocarpa.* O mesmo pode ser dito em relação à presença de indivíduos de *H. stigonocarpa* numa área anexa à EEI, onde Durigan et al. (2002), num levantamento fitossociológico, não registraram a presença de indivíduos nessa área. A última e mais provável possibilidade, porém preocupante, é a de que os possíveis doadores devem estar desprotegidos em fragmentos com menos de 10 ha no entorno da EEI, demonstrando assim a necessidade imediata do Estado em adquirir áreas anexas à EEI para proteger a *H. stigonocarpa* da extinção gerada pela ação antrópica, assim como outras espécies que podem se encontrar em igual situação.

Outro dado preocupante gerado pela análise de paternidade foi o da dominância de doadores de pólen. Essa dominância eleva a coancestria dos futuros propágulos que irão fixar-se dentro da EEI, reduzindo ainda mais o tamanho efetivo da população e provocando futuros gargalos genéticos (ALDRICH; HAMRICK, 1998; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007). Além disso, a dominância de doadores de pólen aumenta a probabilidade de futuros indivíduos gerarem cruzamentos correlacionados e entre aparentados, como foi observado nas populações estudadas por Moraes, Kageyama e Sebbenn (2007).

6.5 Implicações para conservação

A alta divergência genética encontrada entre as populações da EEA e da EEI, independentemente do parâmetro utilizado, demonstrou que essas populações devem ser tratadas como Unidades Significativas Evolutivas (USE) e como Unidades Independentes para o Manejo (UIM). Essas designações implicam que, apesar da EEA e da EEI possuírem um N_e e uma AMV insuficientes para manter estável a endogamia local de *H. stigonocarpa* em médio prazo, a localização específica das duas unidades de conservação permitiu englobar reservatórios gênicos distintos, importantes para dar início a uma conservação evolutivo-adaptativa (CEA) (FRAZER; BERNATCHEZ, 2001). Entre os aspectos importantes de designar uma USE, seria a necessidade de conservação e monitoramento dos caracteres evolutivos dentro de diferentes reservatórios gênicos espalhados numa macro ou mesoregião (FRASER; BERNATCHEZ, 2001). Desta forma, assumem-se formas independentes para o manejo e conservação de cada população, sem interferir em aspectos evolutivos de caráter regional, como na adaptabilidade local (PALSBOLL; BÉRUBÉ; ALLENDORF, 2007). Assim, programas visando a restauração florestal ou o melhoramento de *H. stigonocarpa* devem contemplar os genótipos de cada USE para que não sejam comprometidos no futuro com uma falta de adaptação local (CAMPBELL; 1979; BOWER; AITKEN, 2008; MCKAY et al., 2005).

Vale ressaltar que a diversidade genética e o potencial evolutivo devem ser mantidos em cada USE. Logo, para fins de conservação *in situ* e *ex situ* nas populações analisadas, a coleta de sementes deve obedecer a uma distância mínima de 750 m quando os indivíduos não estiverem dispostos em reboleiras. Entretanto, quando os indivíduos estiverem em reboleiras, deve-se optar pela coleta de sementes de apenas um indivíduo por reboleira a fim de maximizar a diversidade alélica, caracter importante para bancos de germoplasma, pois, amostrando-se indivíduos não aparentados, reduzem-se os efeitos futuros gerados pela depressão endogâmica. Contudo, por causa da baixa densidade de indivíduos na EEA e na EEI, a coleta de sementes, que deveria respeitar uma distância mínima de 750 m entre matrizes e realizar-se a partir de pelo menos doze matrizes não-endogâmicas e não-aparentadas, torna-se inviável (VENCOVSKY, 1987). Para esses casos, seria necessário coletar sementes de matrizes que estivessem localizadas em áreas de reserva legal (RL) ou em áreas de proteção permanente (APP) no entorno das unidades de conservação em estudo. Assim, isso demonstra a importância da manutenção das RLs e APPs na conservação da *H. stigonocarpa* e de outras espécies do Cerrado.

7 CONCLUSÕES

A transferência de *primers* microssatélites de *H. courbaril* para *Hymenaea stigonocarpa* permitiu a amplificação de produtos sem redução da diversidade alélica, demonstrando sua utilidade em análises de estrutura genética e paternidade para demais populações de *H. stigonocarpa*.

A transferência de *primers* cloroplastidiais universais para *Hymenaea stigonocarpa* permitiu a amplificação de vários haplótipos em uma única população, mostrando-se útil para estudos de aspectos filogeográficos e de análise da estrutura genética espacial (EGE).

A EGE nas populações estudadas foi influenciada principalmente pela dispersão restrita de sementes e, especificamente, pela propagação vegetativa na EEI.

A ocorrência de propagação vegetativa nos indivíduos de *Hymenaea stigonocarpa* da EEI, cerrado típico onde ocorre fogo, pode explicar a sua não ocorrência na EEA, cuja fisiomonia é o cerradão, onde o fogo é muito raro.

Os dados de estrutura genética foram influenciados pela propagação vegetativa na EEI, demonstrando a necessidade de identificação de clones, para que as estimativas não apresentem erros devido à duplicidade de genótipos na amostra.

Em decorrência de um fluxo gênico restrito via sementes e da grande distância geográfica entre as duas populações, a divergência genética entre as mesmas foi alta, fazendo com que cada população fosse considerada uma Unidade Independente para o Manejo (UIM) e, ao mesmo tempo, uma Unidade Evolutiva Significativa (USE).

A EEA e a EEI apresentaram um tamanho efetivo (N_e) e uma área mínima viável (AMV) insuficientes para manter estável a endogamia local de *H. stigonocarpa* em médio prazo.

REFERÊNCIAS

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

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.

ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L. Reproductive dominance of pasture trees in fragmented tropical forest mosaic. **Science**, Washington, v.281, p. 103-105, 1998.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado:** espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA- CPAC, 1998. 464p.

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.

APPLIED BIOSYSTEMS. Genescan 3.7. Califórnia, 2001. 1 CD-ROM.

APPLIED BIOSYSTEMS. Genotyper 2.0. Califórnia, 1996. 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, 2007.

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, 2007.

ARROYO, M.T.K. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advancesin legume systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1981. p.723-769.

AZEVEDO, V.C.R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudo da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba - *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev. Sapotaceae**. 2006. 215p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

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

BALLOUX, F.; LEHMANN, T. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. **Genetics**, Austin, v. 164, p.1635–1644, 2003.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microssatelite markers. **Molecular Ecology,** Oxford, n.11, p.155-165, 2002.

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.

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

BOREM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, 2006. 374p.

BOTELHO, S.A.; FERREIRA, R.A.; MALAVASI, M.M.; DAVIDE, A.C.; MAYWORM, M.A.S.; NASCIMENTO, A.S.; SALATINO, A. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) – Fabaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.1, p.144-152, 2000.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.32, n.3, p.314-331, 1980.

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.

BRAMMER, S. P. **Variabilidade isoenzimática em populações naturais de *Hordeum stenostachys* (Poaceae)**. 1993. 264p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

BULHÃO; C.F.; FIGUEIREDO, P.S. Fenologia de leguminosas arbóreas em uma área de cerrado marginal no nordeste do Maranhão. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, n.3, p.361-369, 2002.

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

CARLINI-GARCIA, L.A.; VENCOVSKY, R.; COELHO, A.S.G. Métodos bootstrap aplicados em níveis de reamostragem na estimação de parâmetros populacionais. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v.58, n.4, p.785-793, 2001.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, PR, EMBRAPA/CNPF, 640p. 2006.

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

CASTELLEN, M. da S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**. 2005. 104 p. Tese (Doutorado em Ecologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CEPAGRI/UNICAMP. Clima dos Municípios Paulistas (série histórica de 1961-1990). Disponível em:**<http://orion.cpa.unicamp.br/portal/modules.php?name= climasp&file=municipios>**. Acesso em: 1 Fev. 2006.

CHANG, Y. K.; SILVA, M. R.; GUTKOSKI, L.; SEBIO, L.; SILVA, M.A.A.P. Development of extruded snacks using jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and cassava starch blends. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 78, n. 1, p. 59-66, 1998.

CIAMPI, A.Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado**. 1999. 204p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, 1999.

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.

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.

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

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

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.A.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, Cary, n.83, p.748-756, 1999.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, Oxford, n.10, p.349-356, 2001.

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.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**. 2004. 124 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

COUTINHO L. M. **Aspectos do Cerrado**. 2000. Disponível em: **<http//:www.ecoib.usp.br/ cerrado/index.htm>**. Acesso em: 12 Fev. 2008.

COUTINHO, L. M. O conceito de Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo**,** n.1, p. 17-23, 1978.

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.

CRESTANA, C. S. M.; MARIANO, I.S. Ecologia de polinização *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, o jatobá. **Silvicultura**, São Paulo, v. 17, n. 19, p. 31 - 37, 1985.

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.

CROW, J. F.; AOKI, K. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.81, p.6073-6077, 1984.

DEFAVARI, G. R.; TARAZI, R.; MORO, G.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y. Evidência de estruturação em uma população de *Hymenaea stignocarpa* Mart. ex. Hayne no cerrado de Itirapina - SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2007. p. 27.

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.

DIAS, B.F.S. Cerrados: uma caracterização. In: DIAS, B.F.S. (Ed.). **Alternativas de desenvolvimento dos cerrados**: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis. Brasília: Fundação Pró-Natureza, 1996. p. 11-25.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. **Agrotrópica**, Ilhéus, v. 3, n. 3, p. 119-27, set./dez. 1991.

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.

DIGGLE, P.K.; LOWER, S.; RANKER, T.A. Clonal diversity in alpine populations of Polygonum viviparum (*Polygonaceae*). **International Journal Plant Science**, Chicago, v.159, p. 606–615, 1998.

DINIZ-FILHO, J.A.F.; TELLES, M.P.C. Optimization procedures for establishing reserve networks for biodiversity conservation taking into account population genetic structure. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, p.207–214, 2006.

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.

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

DURIGAN, G.; NISHIKAWA, D.L.; ROCHA, E.; SILVEIRA, E.R. da; PULITANO, F.M.; REGALADO, L.B.; CARVALHAES, M.A. PARANAGUÁ, P.A.; RANIERI, V.E.L. Caracterização de dois estratos da vegetação em uma área de cerrado no município de Brotas, SP, Brasil, **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 16, n. 3, p. 251-262, 2002.

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.

DYER, R.J.; WESTFALL, R.D.; SORK; V.L.; SMOUSE, P.E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape V: a stepwise approach for extracting factors contributing to pollen structure. **Heredity**, London, v.92, p.204–211, 2004.

EISEN, J.A. Mechanistic basis of microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (Ed.) **Microsatellites:** Evolution and Applications. Oxford: University Press, Oxford, 1999. p. 34-48.

EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**, New York, n.38, v.2, p.201-341, 1972.

EITEN, G. Vegetação. In: PINTO, M. N. (Ed.). **Cerrado - Caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: Edunb., 1994. p.17-74.

EITEN, G.; SAMBUICHI, R.H.R. Effect of long-term periodic fire on plant diversity in a cerrado region. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVA, 1., 1996. Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1996. p.46-55.

ENNOS, R.A.; SINCLAIR, W.T.; HU, X-S; LANGDON, A..Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: HOLLINGSWORTH, P.M.; BATEMAN, R.M.; GORNALL, R.J. (Ed.). **Molecular Systematics and Plant Evolution**. London: Taylor and Francis, 1999. p.1-19.

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.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecology, **Evolution and Systematics**, Palo Alto, v.34, p.487–515, 2003.

FELFILI, J.M.; SCARIOT, A.O.; SILVA, J.C.S. Biodiversidade, ecologia e conservação do cerrado: Avanços do conhecimento. In: SCARIOT, A. O.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Biodiversidade, ecologia e conservação do cerrado**, Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 25-44.

FERREIRA J.R.O., 2002. GPS Trackmaker. Disponível em:**<http://www.gpstm.com>**. Acesso em: 30 Maio 2007.

FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: CENARGEN-EMBRAPA-Ministério da Agricultura e do Abastecimento,1998. 220p.

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.

FRAZER, D.J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. **Molecular Ecology**, Oxford, n. 10, p.2741-2752, 2001.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.

GARANT, D.; FORDE, S.E.; HENDRY, A.P. The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. **Functional Ecology**, London, n. 21, p.434-443, 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.

GIBBS, P.E.; OLIVEIRA, P.E.; BIANCHI, M.B. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of Brazilian cerrados. **International Journal Plant Sciences**, Chicago, v.160, n.1, p. 72-78, 1999.

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/softwares/fstat.html>**. Acesso em: 07 Mar. 2008.

GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.3, n.3, p.369-379, 2004.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. **Humanidades**, Brasília, n.48, p.110-114, 2001.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. de. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUIDUGLI, M. C. **Estudos de estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Hymenaea courbaril* L. utilizando marcadores moleculares SSR e RAPD**. 2007. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Ribeirão Preto, 2007.

GUIMARÃES, F.L.C.; MALUF, A.M.; BARBEDO, C.J.; BILIA, D.A.C. Germinação e dormência de sementes de *Hymenaea Courbaril* L. (Leguminosae - Caesalpinoideae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 239-243, 1995.

HAMILTON, M.B. Tropical tree gene flow and seed dispersal. Deforestation affects the genetic structure of the surviving forest fragments. **Nature**, London, v.401, n.9, p.129-130, 1999.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

HANDEL, S.N. The intrusion of clonal growth patterns on plant breeding systems. **The American Naturalist**, Chicago, v.125, p.367-384, 1985.

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.; BANDOU, 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.

HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.16, p.629–636, 2001.

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution,** Lancaster v. 59, n.8, p.1633-1638, 2005.

HERINGER, E.P. Flora micológica das espécies do cerrado de Paraopeba (Minas Gerais) e arredores. **Cerrado**, Brasília, v.3, n. 14, p.9-14, 1971.

HERINGER, E.P.; FERREIRA, M.B. Árvores úteis da região geoeconômica do Distrito Federal: dendrologia: o gênero *Hymenaea*. **Cerrado**, Brasília, v. 7, n. 27, p. 27-32, 1975.

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.

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.

IBAÑES, B.; TARAZI, R.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y. Distribuição espacial de *Diospyros hispida* por classe de diâmetro em uma parcela no cerrado da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina, SP. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 16., Ribeirão Preto, 2008. **Anais...** Ribeirão Preto, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Ecossistemas – Cerrado. Disponível em:**<http://www.ibama.gov.br>**. Acesso em: 14 Abr. 2008.

INSTITUTO FLORESTAL - IF. Estação Experimental e Ecológica de Assis. Disponível em: **<http://www.iflorestsp.br/dfee/e_exp_as.htm>**. Acesso em: 14 Abr. 2008.

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. 2008.

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.
JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, form molecules to populations and back.**Trends in Evolution and Ecology**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; PERECIN, M.B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 64, p. 93-107, 2003.

KAGEYAMA, P.Y. In: KAGEYAMA, P.Y.; OLIVEIRA, R.E.; MORAES, L.F.O.; ENGEL, V.E.; GANDARA, F.B. (Ed.). **Biodiversidade e Restauração da Floresta Tropical**. Botucatu: FEPAP, 2003.

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.

KER, J. C.; RESENDE, M. Recursos edáficos dos cerrados: ocorrência e potencial. In: SIMPÓSIO SOBREO CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 1.,1996, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa-CPAC. p. 15-19.,1996.

KHUDAMRONGSAWAT, J.; TAYYAR, R.; HOLT, J.S. Genetic diversity of giant reed (*Arundo donax*) in the Santa Ana River, California. **Weed Science**, Washington, v.52, p.395-405, 2004.

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

KLINK, C.A.; MOREIRA, A. Past and current human occupation, and land use. In: OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, R.J. (Ed.). **Ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p.69-88.

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.; BORGO, 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.

LACEY, C.J., JOHNSTON, R.D. Woody Clumps and Clumpwoods. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, n.38, p.299-334, 1990.

LANGENHEIM, J.H.; LEE, Y.; MARTIN, S.S. An evolutionary and ecological perspective of Amazonian Hylaea species of *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Acta amazonica**, Manaus**,** v.3, n.1 p. 5-38, 1973.

LEE, Y.; LANGENHEIM, J.H. **Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinoideae, Detarieae)**. Los Angeles: University of California Press, Berkeley, v.69, 1975. 190p.

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.

LEVIN, D.A. Consequences of stochastic elements in plant migration. **The American Naturalist**, Chicago, v. 132, n. 5, p. 643-651, 1988.

LEVIN,D.A.; KESTER,H.W. Gene flow in seed plants. **Evolutionary biology**, New York, v.7, p.139-220, 1974.

LEWINSOHN, T.M. **Predação de sementes em *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae): aspectos ecológicos e evolutivos.** 192p. Dissertação (Mestre em Biologia) - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas. 1980.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Disponível em: **<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/ software.html>**. Acesso em: 18 Dez. 2006.

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 cerradão no município de Caiapônia, GO, Brasil, **Bioscience Journal,** Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 81-89, 2007.

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.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 2002. 352p.

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.

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.

MACEDO, M.C.M.; KICHEL, A.N.; ZIMMER, A.H. **Degradação e alternativas de recuperação e renovação de pastagens**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC. 2000. 4p. (Comunicado Técnico, 62).

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.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical cofindence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p.639-655, 1998.

MARTINS, K. **Diversidade genetica 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.

MARTINS, K.; SANTOS, J.D.; GAIOTTO, F.A.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae) em fragmentos florestais do Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, p. 61-69, 2008.

MATIOLI, 2006. Processos evolutivos e genética de populações. 2000. Disponível em: **<http://dreyfus.ib.usp.br/bio212/>**. Acesso em: Dez. 2008.

MATTOS, P.P. de; TEIXEIRA, L.L.; SEITZ, R.A.; SALIS, S.M. de; BOTOSSO, P.C. **Anatomia de madeiras do Pantanal Mato-Grossense**: características microscópicas. Colombo: Embrapa Florestas; Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 190 p.

MATUDA, T.G.; NETTO, F. M. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p. 1-36, 2005.

MCGARIGAL, K.; CUSHMAN, S.A. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. **Ecological Applications**, Boulder, v.12, p.335–345., 2002.

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 multipléx. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA/CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE GENÉTICA, 52., 2006. Foz do Iguaçu: **Resumos…** Foz do Iguaçu, 2006.

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.

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, 1998. p. 288-556.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. PROBIO. **Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica brasileira: relatório de atividades 1996-2002**. Brasília, 2002. 75p.

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. **Estrutura de populações de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Annonaceae) e *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae) em quatro fragmentos de cerrado *sensu lato* no município de Itirapina/SP.** 2004. 114p. Dissertação (Mestre em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

MORAES, M.L.T.; MORAES, S.M.B.; POLIZELI, M.L.T. M.; SÁ, M.E.; SÁ, A.A.B. Composição química de sementes de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*). **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 11, n. 2, set. 2001. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Resumos...** Curitiba, 2001. p.264.

MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em pequenas populações fragmentadas e em árvores isoladas de *Hymenaea stigonocarpa*. **Scientia Forestalis**, São Paulo, v. 74, p. 75-86, 2007.

MORO, G.; DEFAVARI, G.R.; SALUSTIO, P.E.B.; TARAZI, R.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Análises fenológicas preliminares de Jatoba-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*) no cerrado da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina-S.P. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 56., São Paulo. 2007. **Anais...** São Paulo, 2007.

MOTTA-JUNIOR, J.C.; GRANZINOLLI, M.A.M.; DEVELEY, P.F. Aves da Estação Ecológica de Itirapina, Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 207-227, 2008.

MÜLLER, C. **Expansion and modernization of agriculture in the Cerrado – the case of soybeans in Brazil's center-West.** Department of Economics Working. Brasília: Universidade de Brasília, 2003. 25p. (Paper 306).

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.

NAMKOONG. G. **Decision making strategies for conservation and use of forest genetic resources.** In: INTERNACIONAL CONFERENCE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY FOR MANAGING PLANT GENETIC DIVERSITY IN THE 21 CENTURY. 2000. Rome. **Paper…** Rome. Palm oil resource institute of Malaysia (PORIM) e IPGRI, 2000. 16p.

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.

NEI, M. F-Statistic and analysis of gene diversity in subdividid populations. **Annual Human Genetics**, New York.41, n.10, p.225-233, 1977.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

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 FILHO, A.T. de. Composição florística e estrutura comunitária da floresta de galeria do Córrego da paciência, Cuiabá (MT). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 3, n. 1, p. 91-112, 1989.

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.

OLIVEIRA, R. de. **Secreção de néctar e atividades de morcegos em *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioidea) no Pantanal de Nhecolândia e remanescente urbano de Cerrado, Mato Grosso do Sul.** 2006.31p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

OLMSTEAD, R. G.; PALMER, J. D. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. **American Journal of Botany**, Columbus, n.81, p.1205–1224, 1994.

OUBORG, N.J.; VERGEER P.; MIX, C. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 94, n.6, p.1233-1248, 2006.

PAIVA, E.A.S; MACHADO, S.R.Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae - Caesalpinioideae). **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 20, n. 2, p.471-482, 2006.

PALSBOLL, P.J.; BÉRUBÉ, M., ALLENDORF, F.W. Identification of management units using population genetic data,**Trends in Ecology & Evolution,** Amsterdam, v. 22, n. 1**,** p. 11-16, 2007.

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

PENHA, A.S. **Propagação vegetativa de espécies arbóreas a partir de raízes gemíferas: representatividade na estrutura fitossociológica e descrição dos padrões de rebrota de uma comunidade florestal, Campinas, São Paulo**. 1998. 115p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

PEREIRA, M.F. **Desenvolvimento de marcadores moleculares SSR e caracterização genética de populações naturais de *Annona crassiflora* Mart. no estado de Goiás**. 2007. 152p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

PERTOLDI, C.; BIJLSMA, R.; LOESCHCKE, V. Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. **Biodiversity and Conservation**, London, v.16, n.14, p.4147-4163, 2007.

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 Microssatélites 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.

PRIMACK, R. B. **Essentials of conservation biology**. Sunderland: Sinauer Associates, 1993. 564p.

PROVAN, J.; POWELL, W.; Hollingsworth, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution,** Amsterdam, v.16, n.3, p. 142-147, 2001.

PROVAN, J.; SORANZO, N.; WILSON, N.J.; GOLDSTEIN, D.B.; POWELL, W. A Low Mutation Rate For Chloroplast Microsatellites. **Genetics**, Austin, v. 153, p. 943-947, 1999.

RAMOS, A.C.S.; LEMOS-FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Phylogeographical Structure of the Neotropical Forest Tree *Hymeneae courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its Relationship with the Vicariant *Hymenaeae stigonocarpa* from Cerrado. **Journal of Heredity**, Washington, v. 100, n. 2. p. 206-216, 2009.

RAMOS, A.C.S.; LEMOS-FILHO, J.P.; RIBEIRO, R.A.; SANTOS, F.R.; LOVATO, M.B. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. **Annals of Botany**, Oxford, v.100, p. 1219–1228, 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.

RIBEIRO, J.F.; SILVA, J.C.S. Manutenção e recuperação da biodiversidade do Bioma Cerrado: o uso de plantas nativas. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 8., 1996. Brasília. **Anais...** EMBRAPA–CPAC Brasília. 1996. p. 10-14.

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. London: Unwin Hyman, 1997. 529p.

RIZZINI, C.T. **Plantas do Brasil:** árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 294p.

RODRIGUES, R.R. **Colonização e enriquecimento de um fragmento florestal urbano após a ocorrência de fogo, Fazenda Santa Elisa, Campinas, SP: avaliação temporal da regeneração natural (66 meses) e do crescimento (51 meses) de 30 espécies florestais plantadas em consórcios sucessionais**. 1999. 167p. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1999.

ROEL, A.R.; ARRUDA, E. Agroecologia e os recursos naturais de fragmentos de vegetação nativa. In: COSTA, R.B. da (Org.). **Fragmentação dos cerrados**. Campo Grande: UCDB/Conservation, v. 1, 2003. p. 235-239.

SALA, O.E; CHAPIN III, F.S.; ARMESTO, J.J; BERLOW, E.; BLOOMFIELD, J.; DIRZO, R.; HUBERSANWALD, E.; HUENNEKE, L.F.; JACKSON, R.B.; KINZIG, A.; LEEMANS, R.; LODGE, D.M.; MOONEY, H.A.; OESTERHELD, M.; POFF, N.L.; SYKES, M.T.; WALKER, B.H.; WALKER, M.; WALL, D.H. Global biodiversity scenarios for the year 2100. **Science**, Washington v. 287, p. 1770-1774, 2000.

SANCRISTOBAL, M.; CHAVALET, C. Error tolerant parent identification from a finite set of individual. **Genetical Research**, London, v.70, p.53-62, 1997.

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, K. L. ; WELTER, L. J.; DANTAS, A. C. DE M.; GUERRA, M. P.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus spp* to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization, **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, n.1, p. 73-79, 2007.

SAUNDERS, D.A.; HOBBS, R.J.; MARGULES, C.R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, Arlington, v.5, p.18–32,1991.

SEBBENN, A. M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze] por caracteres quantitativos e isoenzimas.** 2001. 210 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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.

SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M.S.; BAWA, K.; SEBBENN, A., M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* M. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 17, p. 23-43, 2005.

SILVA, D. A. Levantamento do meio físico das Estações Ecológica e Experimental de Itirapina, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 113-128, 2005.

SILVA, J.A.; SILVA, D.B.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA-CPAC: EMBRAPA-SPI, 1994. 166p.

SILVA, J.F., FARIÑAS, M.R., FELFILI, J.M.; KLINK,C.A. Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. **Journal of Biogeography,** Oxford, v.33, n.3, p.536-548, 2006.

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

SILVA, M.R.; SILVA, M.A.A.P.; CHANG, Y.K. Uso de farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) em biscoitos tipo "cookie". **Alimento e Nutrição**, São Paulo, v. 10, p. 7-22, 1999.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P.; CHANG, Y. K. Utilização da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na elaboração de biscoitos tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 25-34, 1998.

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.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systems**, Palo alto, v.16, p.393-430, 1985.

SMOUSE, P.E.; DYER, R.J.; WESTFALL, R.D.; SORK, V.L. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. **Evolution**, Lancaster, v.55, p.260–271, 2001.

SORK, V.L.; NASON, J.; CAMPBELL, D. R.; Fernandez, J.F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends Ecology and Evolution**, London, v. 13, n. 5, p. 219-224, 1999.

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

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A.Y. (2001) Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea* ssp Leguminosaea) utilizando microssatélites. EMBRAPA/CENARGEN. Laboratório de genética de plantas. Disponível em: **<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001//index.htm>**. Acesso em: 13 Fev. 2006.

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.

TELLES, M. P. C.; VALVA, F. D.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

TELLES, V.P. Manejo tradicional no Cerrado. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, n.1, p. 1704- 1707, 2007.

TOLEDO, R. M. **Modelagem espacial do fluxo de sementes de Jatobá (*Hymenaea courbaril*), através de marcadores moleculares, na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema, SP**. 2005. 73p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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.

VALOIS, A.C.C.; NASS, L. L.; DE GOES, M. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARESINGLIS, M.C.; **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 1183p.

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.

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

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

VENTURA, A.; BERENGUT, G.; VICTOR, M.A.M. Características edafo-climáticas das dependências do Serviço Florestal do Estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v.4/5, n.4, p.57-140, 1965/66.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.3, n.1, p.13-36, 2000.

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.

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. 2nd ed. Sunderland: Sinaver Associates, 1996. 445p.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v.38, n.6, p.1358-1370, 1984.

WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v. 42, p.9-19, 1999.

WHITMORE, T.C. The conservation of tropical rain forest. In: SOULÉ, M. E.; WILCOX, B.A. (Ed.). **Conservation biology**: an evolutionary-ecological perspective. Sinauer Associates, Sunderland. 1980. p.303-318.

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

YOUNG, A.G.; HILL, J.H.; MURRAY, B.G.; PEAKALL, R. Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the sub-alpine forb Rutidosis 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.

ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analysis in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p.563-584, 2003.

ZUCCHI, M.I., BRONDANI, R.P.V., PINHEIRO, J.B., BRONDANI, C. VENCOVSKY, R. Transferabilityof 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.

ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; COELHO, A.S.G.; MORAIS, L.K. de ; COUTO, M.A.; CHAVES, L.J.; VENCOVSKY, R..Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in brazilian Cerrado utilizing RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 975-980, 2005.