

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Stryphnodendron*
adstringens (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO)

ADRIANO BALARIM DE LIMA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Ciência Florestal

BOTUCATU–SP

Dezembro-2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Stryphnodendron*
adstringens (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO)

ADRIANO BALARIM DE LIMA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Seizo Mori

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Léo Zimback

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp –
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Ciência Florestal

BOTUCATU–SP

Dezembro-2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

L732e Lima, Adriano Balarim de, 1977-
Estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (Barbatimão) / Adriano Balarim de Lima. - Botucatu : [s.n.], 2010
xiv, 53 f. : ils. color., grafs., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010
Orientador: Edson Seizo Mori
Coorientador: Léo Zimback
Inclui bibliografia

1. Genética florestal. 2. Distribuição espacial da população. 3. Diversidade genética. 4. Cerrados. I. Mori, Edson Seizo. II. Zimback, Léo. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE Stryphnodendron
adstringens (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO)"

ALUNO: ADRIANO BALARIM DE LIMA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON SEIZO MORI
CO-ORIENTADOR: DR. LÉO ZIMBACK

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDSON SEIZO MORI



PROF. DR. MIGUEL LUIZ MENÉZES FREITAS



PROF. DR. CELSO LUIS MARINO



PROFA. DRA. ELZA MARIA GUIMARÃES SANTOS



PROF. DR. CÂNDIDO FERNANDO GOUVEA

Data da Realização: 03 de dezembro 2010.

AGRADECIMENTOS

Aos familiares mais próximos.

Ao Prof. Edson Seizo Mori e ao pesquisador Léo Zimback.

A CAPES.

Ao Programa em Ciência Florestal da FCA/UNESP-Botucatu/SP.

Aos amigos e demais pessoas que torceram pela concretização deste trabalho.

Muito Obrigado.

Calado é melhor, calado é sempre melhor.

SUMÁRIO

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------|---------------|
| RESUMO..... | xiii |
| SUMMARY..... | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 6 |
| 2.1 O Estudo da Estrutura Genética de Populações..... | 6 |
| 2.2 <i>Stryphnodendron adstringens</i> - Aspectos Gerais..... | 10 |
| 2.3. <i>Stryphnodendron adstringens</i> – Descrição Botânica..... | 12 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 16 |
| 3.1 Descrição das Áreas de Estudo..... | 16 |
| 3.1.1 Floresta Estadual de Botucatu/SP..... | 16 |
| 3.1.2 Bairro 24 de Maio – Botucatu/SP..... | 17 |
| 3.1.3 Distrito de Rubião Junior – Botucatu/SP..... | 17 |
| 3.1.4 Itu/SP..... | 18 |
| 3.1.5 Horto Florestal Andrade e Silva Avaré/SP..... | 18 |
| 3.2 Análise de Microsatélites..... | 19 |
| 3.2.1. Extração de DNA..... | 20 |
| 3.2.2. Amplificação e Eletroforese de Microsatélites..... | 21 |
| 3.3 Biometria dos Marcadores Microsatélites..... | 23 |
| 3.3.1 Variação Genética..... | 23 |
| 3.3.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Endogamia de Wright..... | 24 |
| 3.3.3 Estrutura Genética..... | 24 |
| 3.3.3.1 Estatísticas F..... | 24 |
| 3.3.3.2 Fluxo Gênico..... | 25 |
| 3.3.3.3 Tamanho Efetivo Populacional..... | 25 |
| 3.3.3.4 Autocorrelação Espacial..... | 26 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| 4.1 Amplificação e Eletroforese de Microsatélites..... | 27 |

SUMÁRIO

| | Página |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 4.2 Heterozigosidade, Diversidade Genética e Coeficiente de Endogamia..... | 34 |
| 4.2.1 Estatística F e Distâncias Genéticas..... | 35 |
| 4.2.2 Autocorrelação Espacial e Reprodução Vegetativa..... | 41 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 44 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Tabela 1. Primers de outras espécies transferidos para <i>Stryphnodendron. adstringens</i> com temperatura de anelamento (T°) e tamanho de fragmentos (pb)..... | 22 |
| Tabela 2. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMBRA 03 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 29 |
| Tabela 3. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMBRA 210 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 29 |
| Tabela 4. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMBRA 06 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 30 |
| Tabela 5. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMBRA 72 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 30 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <p>Tabela 6. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMPaS 02, nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).....</p> | 31 |
| <p>Tabela 7. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco LMCH 14 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).....</p> | 31 |
| <p>Tabela 8. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco LMCH 12 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).....</p> | 32 |
| <p>Tabela 9. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco SP 06 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).....</p> | 43 |
| <p>Tabela 10. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco SCU 56 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1),</p> | |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 33 |
| Tabela 11. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco SCU 62 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 33 |
| Tabela 12. Número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade ou diversidade genética de Nei (1978) (H_{nei}), porcentagem de locos polimórficos (P), índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) e tamanho efetivo (N_e) com base em 100 indivíduos para todos os loco nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 35 |
| Tabela 13. Réplicas com eliminação sequencial de loco das estimativas de coeficiente de endogamia total (F), endogamia entre populações (θp) e coeficiente de endogamia da população (f) de Weir e Cockerham (1984), com suas médias, desvio padrão e intervalo de 1000 reamostragens com limite superior e inferior a 95% de probabilidade..... | 36 |
| Tabela 14. Endogamia total (Fit), endogamia dentro de população (Fis), probabilidade de qui-quadrado de frequências alélicas entre populações (χ^2) e endogamia pela divisão entre populações (Fst) de Wright (1978)..... | 38 |
| Tabela 15. Distâncias genéticas de Wright (1978) abaixo da diagonal e de Rogers (1972) acima da diagonal entre as populações da Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 39 |
| Tabela 16. Endogamia (Fst) acima da diagonal e fluxo gênico (Nm) abaixo da diagonal ocorrendo entre as populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 41 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 17. Dados do Índice de Moran (D) intervalo de confiança (IC) e probabilidade (P) a cada classe de distância entre plantas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> | 43 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Figura 1. <i>Stryphnodendron adstringens</i> - Fragmento de Cerrado <i>sensu strictu</i> . Associação Biodinâmica (ABD). Botucatu/SP, Fev/2010..... | 3 |
| Figura 2. Ação das Forças Evolutivas sobre uma sobre uma população (MORAES, 2007)..... | 7 |
| Figura 3. <i>Stryphnodendron adstringens</i> - Florescimento. Cerrado <i>sensu strictu</i> . Botucatu/SP. Set/2010..... | 14 |
| Figura 4. <i>Stryphnodendron adstringens</i> - Frutificação. Cerrado <i>sensu strictu</i> . Botucatu/SP. Fev/2010..... | 15 |
| Figura 5. Vagem imatura de <i>Stryphnodendron adstringens</i> atacada por pupa. Fonte: ZIMBACK (2008)..... | 15 |
| Figura 6. Dendrograma de distâncias de Rogers (1972) e de Wright (1978) pelo método de UPGMA e consistências dos nós obtidas por 1000 reamostragens entre as populações da Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..... | 40 |
| Figura 7. Correlograma utilizando o índice de Moran (D) entre diferentes distâncias de plantas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> na Floresta Estadual de Botucatu e o intervalo de confiança a 95% de probabilidade..... | 42 |

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO) Botucatu, 2010. 63p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: ADRIANO BALARIM DE LIMA

Orientador: Prof. Dr. EDSON SEIZO MORI

Co-orientador: Prof. Dr. LÉO ZIMBACK

RESUMO

Encontra-se no Cerrado uma flora única no mundo, cujos processos evolutivos são quase completamente desconhecidos, principalmente seus mecanismos de regeneração diante do processo de fragmentação crescente. A pesquisa em questão em questão teve como objetivo buscar informações sobre a estrutura genética de 05 populações de *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE, o Barbatimão, popularmente muito conhecido por sua ação cicatrizante e poder adstringente, qualidade que contribui para a forte pressão econômica sobre o extrativismo da espécie. Foram realizadas coletas de folhas jovens e sementes de 39 matrizes em cada uma das 05 populações que foram avaliadas quanto aos marcadores moleculares microssatélites. Os resultados da pesquisa mostraram que as populações apresentam variabilidade genética intra e interpopulacionais, sendo que o maior percentual ocorreu dentro das populações (98,55%). A heterozigose observada mostrou-se menor que a esperada mostrando a existência de endogamia nas populações. A distribuição espacial mostrou que não há muitos indivíduos aparentados ocorrendo nas proximidades, com base no Índice de Moran encontrado ($I=0,0413$). Embora o Barbatimão tenha mecanismos de regeneração da parte aérea a partir de gemas que estão presentes no sistema subterrâneo, a semente caracteriza-se como a ferramenta de dispersão predominante.

Palavras-chave: Variabilidade genética, distribuição espacial, estrutura genética, diversidade genética.

STRUCTURE GENETIC OF *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO) POPULATION. Botucatu, 2010. 63p. Thesis (Doctorate in Forest Science). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ADRIANO BALARIM DE LIMA

Adviser: Prof. Dr. EDSON SEIZO MORI

Co-Adviser: Dr. Léo Zimback

SUMMARY

In Cerrado vegetation occurs endemic flora of the world which evolutionary processes are almost completely unknown, mainly on their regeneration mechanisms of fragmentation that have been tremendously increased. *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (Barbatimão) is one of the species of Cerrado, commonly known for its barks to be astringent and used for healing. The present work had as objective to study the genetic structure of five population of barbatimão and to analyze the spatial distribution of genotypes of the species in areas through São Paulo State, Brazil. There are genetic variability intra and interpopulational, where 98.55% of those occurs within population. The observed heterozygosity have presented lower than the expected heterozygosity indicating there is inbreeding into the populations. The spatial distribution, based on Index of Moran ($I=0.0413$), have shown that there is no relatives occurring closely. Although *S. adstringens* presents regeneration mechanism of aerial system using sprout from buds, which are present in subterraneous system, still the seeds characterize as the tool of predominant dispersion.

Keywords: Genetic variability, spatial distribution, genetic structure, genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil dispõe de ricos ecossistemas que comportam biodiversidade ainda por ser conhecida e utilizada mediante o desenvolvimento de pesquisas e planos de manejo. Segundo Clement e Higuchi (2006), tipos de manejo, graus de conservação e desmatamento têm sido vital para o sucesso e fracasso de cada sociedade. Neste cenário, o Brasil assume posição de destaque graças à riqueza de recursos genéticos, complexidade cultural, religiosa, fruto de sua interação com demais culturas imigrantes, fato este, que gerou sistemas locais de saber de valor incalculável, pois incluem informações detalhadas como, por exemplo, sobre a ação medicinal de plantas (ELISABETSKY, 1997).

Pesquisas descrevem que, especificamente, no caso do bioma Cerrado há uma imensa e renovável fonte de plantas medicinais, alimentos, fibras, madeira que têm sido estudadas desde o século passado, sob os mais diferentes aspectos. Extenso relato sobre os principais trabalhos realizados no Cerrado foi apresentado por Goodland e Ferri (1979) salientando que o aproveitamento sensato desta fonte de recursos não ocorra, talvez, em virtude da carência de estudos e pesquisas sobre técnicas de manejo adequadas a este Bioma (BARREIRA *et al.*, 2000).

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil em área sendo superado apenas pela Floresta Amazônica. Muito de suas tipologias são endêmicas da América do Sul e do Brasil (SANO e ALMEIDA, 1998). Inicialmente, a ocupação das regiões do Cerrado restringiu-se a atividades como a pecuária extensiva e o extrativismo de lenha para produzir carvão. A partir de 1970 o bioma tornou-se ameaçado. Foram criados incentivos à ocupação agropecuária da região e ocorreram avanços tecnológicos que possibilitaram novas formas de exploração. O Cerrado passou a ser transformado na principal área de produção de grãos no país, o que trouxe ganhos econômicos e um grande passivo ambiental.

Da mesma forma que para as demais fitofisionomias florestais, a situação do Cerrado já exige providências além da conservação dos remanescentes, ou seja, visando também à restauração da vegetação em áreas degradadas. Para tanto, é necessário destacar que, além da tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade, as espécies do Cerrado apresentam peculiaridades importantes que precisam ser consideradas nos processos de restauração. São heliófitas e apresentam excepcional capacidade de rebrota a partir de estruturas subterrâneas após o corte ou a passagem do fogo. Dessa forma, encontra-se no Cerrado, uma flora única no mundo, cujos processos evolutivos são quase completamente desconhecidos (DURIGAN, 2008).

Dados levantados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) para o relatório “Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IDS) - BRASIL 2010”, mostram que o Cerrado teve sua cobertura vegetal reduzida a quase metade, de 2.038.953 km² para 1.052.708 km², sendo que 85.074 km² (4,18% do total) foram destruídos entre 2002 e 2008. Os Estados que apresentaram, em termos absolutos, maior área desmatada entre 2002 e 2008 foram Mato Grosso (17.598 km²), Maranhão (14.825 km²) e Tocantins (12.198 km²) e, em termos relativos, Maranhão (6,99%), Bahia (6,12%) e Mato Grosso (4,90%).

A análise dos dados mostra que no período de 2002 a 2008 as taxas foram mais altas que as apresentadas para a floresta Amazônica. Segundo o IBGE, é preciso que medidas preventivas sejam colocadas em práticas nas regiões com taxas mais elevadas, ou o bioma será extinto em pouco tempo. O levantamento demonstra uma tendência de aumento das áreas desmatadas vindas do sul e sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e

Goiás) até 2002, e indo para o norte e nordeste do Cerrado (Bahia, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão), no período 2002/2008.

A flora do Cerrado possui grande potencial encontrado em diferentes fisionomias que englobam formações florestais, savânicas, campestres, compostas por uma biodiversidade riquíssima. No elenco das dez plantas medicinais mais utilizadas conforme levantamento etnobotânico realizado por Souza e Felfili (2006) em Goiás, *Stryphnodendron adstringens*, popularmente conhecido como Barbatimão, foi coincidente na indicação de todos entrevistados (GLASENAPP 2007). Além do uso medicinal, as cascas dessa espécie foram utilizadas por muito tempo nos curtumes por sua ação tanante e poder adstringente. Esta espécie, *Stryphnodendron adstringens* - o Barbatimão (Figuras 1) é muito valorizada pela sua ação cicatrizante e apresenta altas densidades em várias localidades do Brasil Central (FELFILI e SILVA *et al.*, 1993).



Figura 1. *Stryphnodendron adstringens* - Fragmento de Cerrado *sensu strictu*. Associação Biodinâmica (ABD). Botucatu/SP, Fev/2010.

O extrativismo descontrolado das cascas do *S adstringens*, somado a fragmentação do Cerrado, constitui-se também como uma ameaça ao bioma, principalmente, por insurgir muitas vezes sobre populações naturais de árvores que já foram reduzidas pela pressão antrópica. O desenvolvimento de pesquisas para a extração de material biológico da natureza atenuaria, em particular, o extrativismo ao *S adstringens* via exploração irracional de cascas para a fabricação de fitofármacos. Sabe-se que a produção anual da casca vem decrescendo de 1500ton/ano para 1000ton/ano, sendo o Estado de Minas Gerais o maior produtor (ALMEIDA e SANO, 1998). Em parte, tal quadro deve-se pelo desenvolvimento de produtos sintéticos. Por outro lado, o Cerrado está desaparecendo e junto com ele muitas alternativas de processos produtivos.

Foi demonstrado em pesquisas que o estoque arbustivo-arbóreo do bioma Cerrado é predominantemente formado pela rebrota de cepas e sistema subterrâneo. Há necessidade, no entanto, de estudos mais pormenorizados que descrevam como se processa sua regeneração natural, como esta se estabelece e se comporta após a exploração da vegetação arbustivo-arbórea, bem como, diante do processo de fragmentação do bioma (BARREIRA *et. al.*, 2000). A regeneração em áreas perturbadas, geralmente não ocorre através do estabelecimento de espécies pioneiras, de ciclo curto, oriundas do banco de sementes. Ocorre principalmente pela brotação de estruturas subterrâneas. Contudo, estudos realizados com poucas espécies demonstram que o processo de regeneração a partir de sementes é de importância fundamental para a manutenção da diversidade genética das populações de plantas do Cerrado. Quantitativamente, a importância da regeneração a partir de sementes na reocupação de áreas perturbadas tem sido pouco estudada (DURIGAN, 2008).

GLASENAPP (2007) estudou a estrutura genética de 04 populações naturais de *S. adstringens* no Cerrado *strictu sensu* no Norte de Minas Gerais e demonstrou que, de forma geral, as frequências alélicas foram similares entre populações, e a maior parte da variação total foi verificada dentro delas. O estudo aponta para baixa diversidade genética encontrada entre as populações podendo ser explicada pelos altos níveis de fluxo gênico. No entanto, tal fato pode estar relacionado ao curto período de tempo decorrido da fragmentação local da população original e, talvez, os reflexos ainda não ocorreram para que as divergências fossem detectadas estatisticamente entre as populações. Dessa forma, com base nos altos índices de fluxo gênico e tamanhos efetivos verificados, o estudo concluiu que estratégias

visando a conservação da diversidade genética de *S. adstringens* implicam na manutenção de populações com grande número de indivíduos.

As áreas do Cerrado como um todo, têm sofrido profundas transformações de natureza antrópica, apresentando crescente processo de degradação (RATTER *et al.* 1997). Sendo assim, o desenvolvimento de pesquisas básicas sobre os processos ecológicos envolvidos na reprodução das plantas do Cerrado é fundamental para uma melhor compreensão da diversidade estrutural e funcional deste bioma e conseqüentemente para o desenvolvimento de ferramentas úteis para a conservação e manejo destes sistemas. Na medida em que a importância da reprodução sexuada de plantas do bioma Cerrado fica evidente (OLIVEIRA e SILVA, 1993, SARAIVA *et al.*, 1996, GIBBS e SASSAKI, 1998; OLIVEIRA e GIBBS, 2000), pesquisas acerca dos mecanismos envolvidos em todas as suas etapas tornam-se cada vez mais necessárias.

Assim, com o intuito de buscar informações sobre mecanismos de sobrevivência de espécies arbóreas em áreas do Cerrado, o trabalho de pesquisa em questão buscou informações especificamente sobre a estrutura genética de 05 populações de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*.) em áreas de Cerrado *sensu strictu* no interior do Estado de São Paulo, através do uso de marcadores moleculares microssatélites, utilizados em diversos trabalhos que visam estimar padrões de distribuição da diversidade genética visando à tomada de decisões na conservação de recursos genéticos. Assim, os objetivos pontuados para o estudo em questão são:

- *Estimar variabilidades genéticas intra e interpopulacionais de 05 populações de Barbatimão - Stryphnodendron adstringens;*
- *Analisar espacialmente a distribuição dos genótipos.*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Estudo da Estrutura Genética de Populações

A estrutura populacional de uma espécie é constituída pela estrutura demográfica determinada pelo nascimento, morte, dispersão, sistemas de cruzamentos, história de vida e, pela estrutura genética que se refere à organização da variabilidade genética dentro e entre populações (FUTUYMA, 1979). O estudo da estrutura genética de populações analisa o genótipo dos indivíduos nas populações, sendo o padrão da variação da distribuição dos genótipos e o grau de fixação gênica dentro e entre as populações, utilizados na inferência da extensão das forças evolutivas atuantes. (SLATKIN, 1994).

A estrutura genética de uma população se evidencia através do estudo da diversidade genética da espécie em estudo, sendo esta analisada sob três perspectivas diferentes: observando indivíduos independentemente, observando uma população em particular e comparando populações distintas. Ao nível de indivíduo a diversidade genética define a frequência relativa dos alelos, que nada mais é que a expressão diferencial do mesmo gene (locos) que são herdados de pai e mãe. A heterozigose, a proporção de locos que possuem alelos distintos dentro de um universo de alelos analisados, é uma medida da

diversidade genética (SLATKIN, 1994). Em termos populacionais, a diversidade genética define tanto o tipo de alelos presentes como suas frequências relativas expresso ao nível de população e ainda entre populações distintas (NASON, 2002).

A diversidade genética entre populações distintas de uma mesma espécie se refere às diferenças existentes na base genética das populações em estudo. Estas diferenças obedecem a fatores biológicos e geográficos detectáveis ao longo da distribuição natural da espécie. A evolução da estrutura genética e sua manutenção no tempo e no espaço estão sujeitas à ação de três forças de efeitos divergentes. Por um lado, a seleção natural e a deriva genética que são forças que favorecem a diferenciação genética e, por outro lado, o fluxo gênico. A Figura 2 ilustra a ação das forças evolutivas.

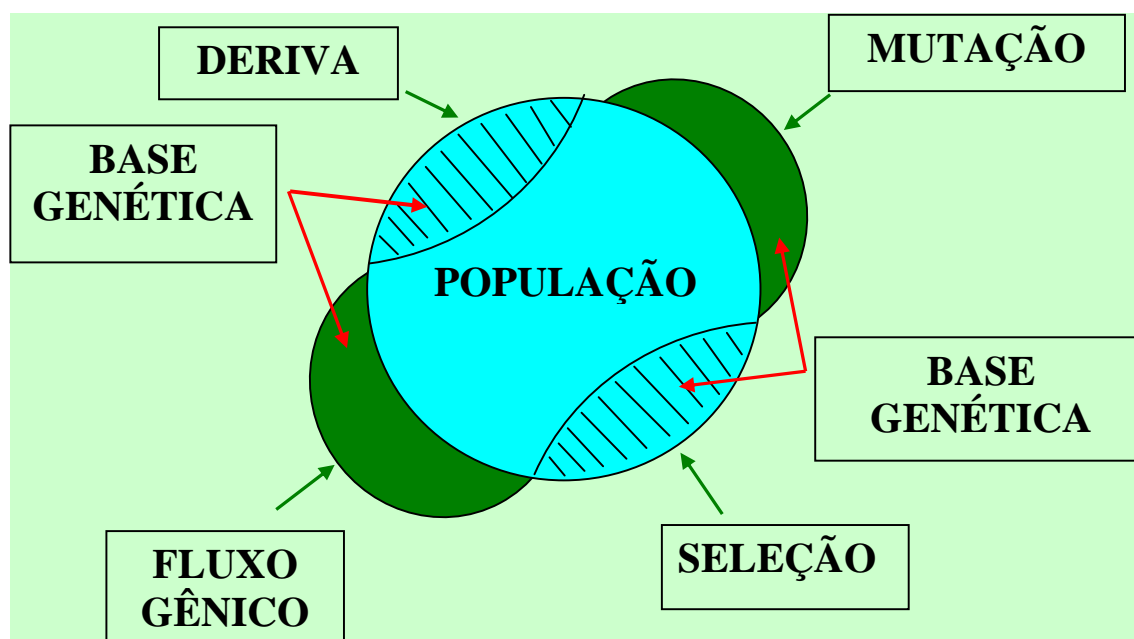


Figura 2. Ação das Forças Evolutivas sobre uma população (MORAES, 2007)

O estudo da estrutura genética das populações proporciona um melhor entendimento sobre as diferentes escalas espaciais em que operam a deriva genética, o fluxo gênico e a seleção natural. Assim, quando as populações encontram-se isoladas, compostas por unidades pequenas, os efeitos adaptativos da seleção natural podem ser muito diminuídos pela força da deriva genética. Uma taxa de fluxo gênico muito alta também poderia interferir

na adaptação das populações nos ambientes naturais, pois, daria continuidade à dispersão da informação genética entre essas unidades. Assim, a seleção natural teria mais condições de atuar frente a limitações do fluxo gênico.

Contextualmente, Futuyma (1979), afirma que a fragmentação dos ecossistemas naturais faz a migração crítica no restabelecimento de populações locais e na contenção de efeitos como depressão por endogamia. O Fluxo gênico, segundo a autora, é o principal componente da estrutura populacional, pois determina a extensão na qual cada população local, de determinada espécie, se comporta como unidade evolutiva independente. Havendo grande quantidade de fluxo gênico entre populações locais, estas evoluem juntas, contrariamente, havendo pouca quantidade de fluxo gênico, cada população evolui quase independentemente.

Aspectos voltados ao estudo das características dos aparatos biológicos do sistema reprodutivo e biologia de reprodução das espécies são importantes neste contexto. Para as espécies lenhosas do Cerrado, estudos revelam que foram encontrados padrões semelhantes aos das plantas de comunidades florestais, apresentando uma grande diversidade de sistemas de polinização e predominância de plantas xenógamas obrigatórias (OLIVEIRA e GIBBS, 2000). Tal fato elucida a fragilidade dos remanescentes atuais, pois, inúmeros fatores intrínsecos são determinantes à manutenção da estrutura genética das populações de árvores, por exemplo.

Konuma *et al.*, (2000) lembram que a fragmentação do Cerrado favorece a ocorrência de cruzamentos restritos entre as populações naturais de árvores, que são gerados por restrições na área de forrageio do polinizador. Além da diminuição na densidade de árvores reprodutivas, podem reduzir as viabilidades populacionais de espécies de árvores que já ocorrem naturalmente em baixas densidades. Assim, ocorre redução da variabilidade genética que é essencial para que a adaptação evolutiva a mudanças ambientais.

Lacy (1986); Alvarez-Buylla *et al.*, (1996), da mesma forma, reforçam que a probabilidade de extinção local aumenta com a redução do tamanho da população, uma vez que gera fatores genéticos e evolutivos prejudiciais ao potencial adaptativo populacional. Estes incluem a perda da variabilidade genética, importante para a evolução adaptativa; a fixação aleatória de mutações deletérias; e a perda de alelos, por deriva e erosão genética. Desse modo, estudos voltados à estimativas do coeficiente de endocruzamento, estrutura e

variabilidade genética, são úteis para se avaliar o papel da erosão genética e a perda de variação potencialmente adaptativa em populações naturais afetadas pela redução populacional (ANDRÉ, 2005).

Para o estudo da estrutura genética de plantas os marcadores moleculares surgiram como uma grande contribuição para o desenvolvimento das técnicas moleculares que permitem a análise do genoma (SILVA, 2010). Tais ferramentas moleculares definidas como marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1998). Souza (2001) explica que qualquer forma alélica originada de um genoma que pode ser utilizada como marcador genético, podendo ser esta um dado fenótipo, uma proteína ou um fragmento de DNA que codifica ou não um gene, possuindo uma sequência repetida ou única no genoma.

Para o estudo da estrutura genética de populações, os marcadores moleculares da classe loco-específicos codominantes mais empregados em plantas são aqueles denominados de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*), conhecidos também como locos microssatélites). Ambos são espécie-específicos e codominantes, ou seja, ambos os alelos de um mesmo loco do indivíduo são visualizados ao mesmo tempo (SOUZA, 2001). Os marcadores RFLP tiveram origem pela utilização de fragmentos de DNA como marcadores genéticos para monitoramento da segregação cromossômica, sendo que são caracterizados pela variação do tamanho dos fragmentos obtidos de diferentes indivíduos, após a digestão com as enzimas de restrição (BOTSTEIN *et al.*, 1980, citados por BORÉM, 1998).

Os microssatélites são seqüências de DNA constituídas de um a seis nucleotídeos de comprimento repetidas em *tandem*, as quais encontram-se ampla e aleatoriamente distribuídas em regiões não-codificadoras dos genomas dos eucariotos (TAUTZ e RENZ, 1984; LITT e LUTY, 1989; André, 2005). Cada seqüência repetitiva constitui um *loco* genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (POWELL *et al.* 1996; MORGANTE e OLIVIERI, 1993; CONDIT e HUBBELL, 1991). Os locos microssatélites, além disso, possuem expressão co-dominante, o que significa que ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados, isso aliado ao multialelismo,

caracteriza esta classe de marcadores moleculares como a de mais alto conteúdo de informação de polimorfismo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Por suas características, os microssatélites apresentam um alto poder de discriminação individual, o que os torna uma poderosa ferramenta em estudos sobre análise de parentesco, fluxo gênico, estrutura genética populacional e inferências sobre eventos demográficos recentes, incluindo impactos antropogênicos sobre as populações (RAFALSKI *et al.*, 1996; CHASE *et al.*, 1996; PEARSE e CRANDALL, 2004), contribuindo de forma significativa para estudos de ecologia populacional e conservação biológica.

2.2 *Stryphnodendron adstringens* - Aspectos Gerais

O *S. adstringens* tem ocorrência típica no campo-cerrado e cerrado *sensu strictu*. Neste último tem densidade variando de 5,6 a 36 indivíduos por hectare. É observado tanto em formações primárias como secundárias. Populações não perturbadas possuem grande potencial de regeneração. Tem preferência por solos arenosos e de drenagem rápida (FELFILI e BORGES FILHO, 2004). Em muitos estudos fitossociológicos do Cerrado *sensu strictu* a espécie foi apontada com IVIs (Índice de Valor de Importância) relativamente altos (ASSUNÇÃO e FELFILI, 2004).

É uma planta não acumuladora de alumínio. Atinge no máximo, em média, 30cm de diâmetro a 0,30m de altura a partir do nível do solo e 5m de altura (ALMEIDA *et al.*, 1998). Segundo Glasenapp (2007) o *S. adstringens* pode ser empregado com sucesso no paisagismo, principalmente na arborização urbana de ruas estreitas. É também recomendado nos plantios mistos em áreas degradadas. Possui madeira resistente e durável em condições adversas, própria para construção civil, obras expostas, marcenaria e torno (ALMEIDA *et al.*, 1998; LORENZI, 1992; PIO CORRÊA, 1996). Durigan (2008) recomenda a espécie para a restauração de áreas de Cerrado e Floresta que foram submetidas a diferentes processos de perturbação, principalmente aquelas com solo bem drenado.

Os segredos medicinais do Barbatimão, *S. adstringens*, foram descobertos pelos povos indígenas que o chamavam de *Iba timo*, que significa árvore que aperta, ou seja, adstringente. A casca já foi levada a Europa sob o nome de “casca brasileira adstringente” (GLASENAPP, 2007). É utilizado no tratamento de diversas doenças, como úlceras, inflamações e hemorróidas através da maceração da casca do caule (BARROS, 1982).

Em decocção é anti-séptica sendo usada no tratamento da gastrite e dor de garganta (HIRSCHMANN e ARIAS, 1990).

Stryphnodendron adstringens, o Barbatimão, é considerada uma das maiores fontes naturais de tanino, contendo em sua casca cerca de 23% deste composto fenólico (PRIMO, 1945). Tal característica lhe confere alto grau de importância econômica. Como adstringente é empregado em larga escala, na medicina popular, em oftalmias crônicas, afecções escorbúticas, hemorragias, diarreia e até na blenorragia (RODRIGUES, 1893) e sua casca pulverizada é aplicada externamente no tratamento de úlceras. Pode servir também como corante avermelhado utilizado nas Indústrias de tinta de escrever (CRUZ, 1965).

Segundo Scallon (2007), na literatura científica apenas um trabalho envolvendo aspectos da polinização e dispersão do gênero *Stryphnodendron* está disponível, especificamente com *S. adstringens*. Ortiz *et al.*, (2003), estudaram duas populações de *S. adstringens* e observaram que ambas foram visitadas por uma diversidade de insetos, sendo que *Hymenoptera* (93,8%) compunha a grande maioria, sendo encontrada ainda uma grande diversidade entre os *Hymenoptera*, na maior parte abelhas (85,6%). Ainda neste estudo foi constatado que *S. adstringens*, apenas 20% das flores produzem néctar, em pequena quantidade, o que segundo os autores não limitava a visitaçao dos insetos por haver uma compensação com a grande quantidade de flores em espigas que podem ser visitadas de uma só vez.

O *Stryphnodendron adstringens* possui atividades farmacológicas que estão diretamente ligadas aos teores de taninos condensáveis, que variam de 20% a 50% dos compostos presentes na planta (CORRÊA 1978). Contudo, Rebecca *et al.*, (2002; 2003); apontam que a exata identidade dos princípios ativos de *S. adstringens* não é conhecida até o momento. Em decorrência desses altos teores de tanino condensáveis, a planta é também empregada na indústria do couro e na fabricação de tinta de escrever, ressaltando a sua importância (JACOBSON *et al.*, 2005). Em alguns lugares do Pantanal o *S. adstringens* caracteriza-se como uma forrageira importante na dieta bovina local. Da cinza da madeira extrai-se a dicoada, uma substância escura que substitui a soda cáustica na fabricação do sabão caseiro (ALMEIDA *et al.*;1998).

2.3 *Stryphnodendron adstringens* - Descrição Botânica

A espécie foi descrita, inicialmente, na FLORA FLUMINENSIS (VELLOZO, 1790), como *Mimosa barba de timan*. Está incluída na FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 2ª Edição, como *Stryphnodendron barbadetiman*, Martius. Esta combinação foi modificada por Coville (Index, 1958) para *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. (Martins, O., 1990), fazendo nova revisão nomenclatural estabeleceu como sinonímia *Acácia adstringens* Mart., *Mimosa barbadetiman* Vell., *S. barbatimão* Mart., *S. bardetiman* Mart., *Mimosa virginalis* Koster.

A espécie, de nome popular Barbatimão, é classificada na divisão Angiospermae, classe Magnoliopsidae, ordem Fabales, família Leguminosae, sub-família Mimosoideae, gênero *Stryphnodendron*. O gênero *Stryphnodendron* tem distribuição com limite norte na Nicarágua e sul, no Estado do Paraná no Brasil. Ocorrem em diversos tipos de vegetação, principalmente no Cerrado e na Amazônia. No Brasil tem distribuição desde o Pará, passando pelo Planalto Central, até Minas Gerais e São Paulo. Entre as espécies do gênero *Stryphnodendron* destacam-se *S. adstringens* (Mart.), *S. angustum* (Benth.), *S. floribundum* (Benth.), *S. coriaceum* (Benth), *S. guyanensis* (Benth.), *S. microstachyum*, *S. obovatum* (Benth.), *S. polyphyllum* (Mart.), sendo todas conhecidas popularmente como barbatimão (RIZZINI e MORS, 1976, PEREIRA, 1992; ALMEIDA *et al.*, 1998).

A espécie é perenifólia com intensa brotação no início do período chuvoso (outubro a abril). A floração coincide com o período seco (maio a setembro). A maturação dos frutos ocorre nos final da estação seca (agosto a setembro), aumentando a probabilidade de germinação e crescimento de plântulas devido ao início da estação chuvosa (FELFILI e BORGES FILHO, 2004). Oliveira (1991), relata que a maioria das espécies de cerrado, inclusive *S. adstringens*, é perenifólia, uma vez que elas mantêm folhas ativas ao longo do ano e também produzem folhas novas por longos períodos.

Felfilli *et al.*, (1999) descrevem que mesmo com um pico de produção de folhas novas e de queda de folhas na estação seca, *S. adstringens* apresentou substituição gradativa da folhagem ao longo do ano e, também, não foi observado um período de desfolhamento total que caracterizasse decíduidade em área do Distrito Federal no Cerrado *sensu strictu*, observando a fenologia de dez árvores dessa espécie por três anos. O estudo

mostra que naquele contexto ambiental, as árvores apresentaram modelo fenológico anual com floração, frutificação, dispersão de sementes e picos de senescência e de emissão de folhas novas, todos na estação seca. Seus frutos perfizeram um longo período de maturação, cerca de 12 meses, alcançando a maturidade na época seca do ano seguinte. Os autores ressaltaram que as ocorrências de queimadas afetaram, de maneira acentuada, as atividades reprodutivas, especialmente a frutificação.

A árvore de *S. adstringens* tem caules e ramos tortuosos, casca rugosa, áspera a fissurada. As folhas são compostas bipinadas, com cinco a oito jugas, com seis a oito pares de folíolos por pina. Apresenta flores com cerca de 6mm de comprimento dispostas em inflorescências do tipo racimo de espiga, corola com pétalas livres. Numerosos estames, pólen em políades, anteras com glândula apical que parece estar relacionada com o fraco odor das flores, filetes com o dobro do comprimento da corola (GLASENAPP, 2007). O número de flores é variável, sendo esta, pequena, de cor marrom, hermafrodita, com longevidade de apenas um dia (Figura 3), produzindo pequenas quantidades de néctar, o que atrai pequenos insetos: *Apis mellifera*, *Bombus spp.*, moscas *Tabanidae* e, especialmente, abelhas *Meliponinae*, como principais polinizadores.

A dispersão parece ser zoocórica (OLIVEIRA 1991). O fruto é um legume sésil, carnoso, linear-oblongo, com cerca de 10cm de comprimento (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1992), como ilustra a Figura 4. A maturação dos frutos ocorre na estação seca, pouco antes do início das chuvas, fato que aumenta a probabilidade de germinação e crescimento das plântulas. A umidade proporcionada pela estação das chuvas e a abundância temporária de nutrientes, devido à decomposição da serrapilheira acumulada na estação seca, permitem também o desenvolvimento de um sistema radicular profundo antes da próxima seca, aumentando as chances de sobrevivência do novo indivíduo (FELFILLI *et al.*, 1999).

As sementes são castanho-avermelhadas de elipsóides a oblongóides, ligeiramente compressas (FELFILI e BORGES FILHO, 2004). As sementes de *S. adstringens* são muito predadas, sendo que mesmo as vagens em fase de maturação mostram vestígios de predação por insetos (Figura 5). Talvez a maturação dos frutos na época seca, quando as populações de insetos estão nos seus níveis mais baixos, seja uma estratégia para evitar a predação (FELFILLI *et al.*, 1999).

A semente como a vagem são fontes de alimento para insetos no Cerrado, além de servir também de alimento para pequenos roedores (OLIVEIRA, 1991). De forma geral, o padrão anual de floração e frutificação e a grande fertilidade, com todas as árvores frutificando todos os anos, quando não perturbadas pelo fogo, contribuem bastante para a manutenção da abundância da espécie na comunidade. Isso compensaria a desvantagem trazida pelo longo tempo de maturação dos frutos, quando ficam expostos à predação (FELFILLI *et al.*, 1999). Contudo, Ortiz *et al.* (2003), ao verificarem o sistema de reprodução de *S. adstringens* constataram que a espécie é não endogâmica e a produção de frutos muito baixa. A porcentagem de frutos obtidos por autofecundação (2,82%) foi consideravelmente menor do que os obtidos por polinização cruzada (35,48%).



Figura 3. *Stryphnodendron adstringens* - Florescimento. Cerrado *sensu strictu*. Botucatu/SP. Set/2010.



Figura 4. *Stryphnodendron adstringens* - Frutificação. Cerrado *sensu strictu*. Botucatu/SP. Fev/2010.



Figura 5. Vagem imatura de *Stryphnodendron adstringens* atacada por pupa. Fonte: ZIMBACK (2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição das Áreas de Estudo

A definição das 5 (cinco) populações para o estudo em questão se fundamentou na disponibilidade de áreas que pudessem contribuir sem restrições a atividades de pesquisa onde, por exemplo, fosse possível realizar coletas de material como sementes e folhas. Neste aspecto, a logística também foi levada em consideração, pois, diante de algum evento no laboratório onde houvesse a necessidade de um retorno ao campo, populações escolhidas sob distâncias muito grandes poderiam se configurar num fator limitante no decorrer do estudo.

Foram então selecionadas 5 (cinco) populações de *S. adstringens* para o estudo em questão: 3 (três) localizadas no município de Botucatu/SP, 1 (uma) no município de Avaré e 1 (uma) no município de Itu/SP. Em seguida, estão dispostas informações sobre a localização e o contexto ambiental onde as populações encontram-se distribuídas.

3.1.1 Floresta Estadual de Botucatu/SP

A Floresta Estadual de Botucatu é composta por uma área de 33 hectares. Fica localizada no perímetro urbano do município de Botucatu/SP, entre as coordenadas geográficas: 22° 55' 55" e 22° 56' 39" de latitude Sul e 48° 27' 19" e 48° 27' 33"

de longitude Oeste. É uma Unidade de Conservação da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e pertence à Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, afluente do Paranapanema, próximo ao divisor de águas com o rio Capivara, pertencente à Bacia Hidrográfica do Médio Tietê.

A Unidade de Conservação possui relevo ondulado de 816 a 865m de altitude com vegetação de campo de cerrado e mata de várzea. Possui latossolo vermelho distrófico típico A moderado álico, cambissolo háplico Tb distrófico e gleissolo háplico Tb distrófico álico. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região pode ser enquadrado no tipo Cwb, mesotérmico de inverno seco, onde a temperatura média do mês mais quente não ultrapassa 22 ° C, sendo julho o mês mais seco e mais frio. A estação seca é de maio a setembro, sendo janeiro o mês mais quente e úmido. A precipitação média anual é de 1314 mm e a temperatura média mensal de 19,4 °C.

No seu entorno a Unidade de Conservação apresenta 100ha de fragmentos de vegetação de cerrado de campo cerrado e cerrado *sensu strictu* com estimativa de 1000 (mil) indivíduos de *S. adstringens* e aproximadamente 200 (duzentos) dentro da Unidade de Conservação, sendo, portanto, um fragmento pequeno, com potencial de diversidade, talvez, ainda não isolado, uma vez que a polinização é feita por abelhas e notadamente foi observada a presença de abelhas no local e os fragmentos apresentam menos de um quilômetro de distância entre eles.

3.1.2 Bairro 24 de Maio – Botucatu/SP

Este fragmento é composto por uma área de 10ha. Fica localizado, aproximadamente, a 2,8Km a nordeste da Floresta Estadual de Botucatu e encontra-se isolado pelo processo de urbanização. Este, por sua vez, é um processo crescente e somado a isto, o fato de apresentar-se como um loteamento abandonado, pode ser desmatado a qualquer momento, de tal forma que, houve interesse em verificar a ocorrência de fluxo gênico entre as duas populações. Esta população possui aproximadamente 260 indivíduos de *S. adstringens*.

3.1.3 Distrito de Rubião Junior – Botucatu/SP

Este é o menor fragmento entre as cinco áreas escolhidas para o estudo em questão composta por 2ha de área. Sua localização dista 5,5 Km a noroeste da Unidade de

Conservação da Floresta Estadual de Botucatu. Quando comparado ao Bairro 24 de Maio, este fragmento encontra-se mais isolado de demais comunidades florestais. Dessa forma, tentou-se verificar se há efeito de erosão genética. Os dois fragmentos possuem clima, solo e altitude semelhantes com a Floresta Estadual de Botucatu. Esta população tem aproximadamente 350 indivíduos de *S. adstringens*.

3.1.4 Itu/SP

A Área de Tiro do Exército localizada no município de Itu/SP situa-se entre as coordenadas 23° 21' 53" e 23° 23' 24" de latitude Sul e 47° 18' 06" e 47° 19' 24" de longitude Oeste. Esta área possui 200ha de vegetação de cerrado sendo utilizada para exercícios militares. Ao seu entorno coexistem muitos fragmentos de vegetação de cerrado *sensu stricto*, próximos, de modo que a área não é isolada. Estima-se que existam distribuídos nesta área, aproximadamente, 1000 indivíduos de *S. adstringens*.

3.1.5 Horto Florestal Andrade e Silva – Avaré/SP

Situado no Município de Avaré/SP o Horto Florestal Andrade e Silva é composto por uma área 720ha a beira do Rio Novo, afluente do Rio Pardo, pertencente à Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema. Situa-se entre as coordenadas 22° 59' 51" a 23° 01' 30" Oeste e 48° 48' 27" a 48° 50' 15" Sul. Possui relevo de colinas amplas, com altitude média de 750m e média anual de temperatura de 19,1°C, sem estação seca. A vegetação é representada por remanescente de floresta estacional semidecidual nas cotas mais baixas e vegetação de cerrado nas cotas mais altas, com solo arenoso nas cotas mais altas e textura média nas cotas mais baixas. A população de *S. adstringens* nesta área é menor com estimativa de 80 indivíduos, com predominância de *S. polyphyllum* que não ocorre nas outras áreas.

3.2 Análise de Microsatélites

Foram coletadas folhas jovens e sementes de 39 matrizes em cada uma das cinco populações de *S. Adstringens* em 2007. Contudo, neste ano, as chuvas foram muito irregulares e a formação de vagens do *Stryphnodendron adstringens* foi muito fraca. Assim, 20 matrizes produziram sementes suficientes, isto porque tanto a semente como a vagem são fontes de alimento para insetos no Cerrado como pudemos observar, além de servir também de alimento para pequenos roedores (OLIVEIRA, 1991).

A Bacia do Rio Pardo possui muitos fragmentos de cerrado, a partir de Pardinho/SP até Ourinhos/SP, sendo que, em passado recente existia uma interligação entre estes fragmentos acompanhando o eixo da Rodovia Castelo Branco. Na região, o Barbatimão foi explorado principalmente para curtume, de modo que, além da fragmentação, ocorreram cortes de muitas árvores inteiras para extração de casca, conforme informações colhidas junto a antigos cortadores de árvores na região.

Das sementes colhidas, muitas foram devoradas por lagartas na vagem e colonizadas por carunchos que emergiam em quantidade das sementes que já haviam sido ovipositadas em campo. O expurgo com fosfina, apenas evitou novas oviposições e eliminou as recentes, no entanto, os danos internos já haviam ocorrido.

Na germinação, as matrizes que tinham número pequeno de sementes, não conseguiram produzir as 15 mudas necessárias. Muitos outros problemas ocorreram, como podridões de plântulas, sementes chochas atacadas por caruncho e o secamento de plântulas já germinadas, dando mostras da falta de alguma simbiose na raiz. Acredita-se que a utilização de solo colhido ao lado das árvores de *S. adstringens* auxiliou no pegamento de mudas. Todavia, não foi possível instalar teste de progênies para o estudo em questão.

Observa-se que o *S. adstringens* apresenta um processo biológico forte de seleção natural na fase de sementes e alguma interação biótica na natureza, sendo uma espécie que necessita de um grande volume de sementes para se produzir mudas. No ano de 2008, as chuvas foram mais regulares e a maioria das árvores frutificaram abundantemente em todos os locais. Dessa forma, as sementes foram colhidas posteriormente, no mês de junho para se completar a população da Floresta Estadual de Botucatu e as demais populações.

3.2.1. Extração de DNA

A folha do *S. adstringens* possui muito tanino, dificultando a extração de DNA. O tanino é de difícil limpeza e, após extração, sempre aparece na leitura de 230 nanômetros, principalmente se forem usadas folhas congeladas ou secas. Foram necessários muitos testes de extração de DNA chegando-se ao seguinte protocolo modificado com CTAB 2% de Ferreira e Guatapaglia (1995). O protocolo usado é o seguinte:

1. Pesquisar duas subamostras de 50 mg.;
2. Moer as duas sub-amostras aplicando 600 μ L de CTAB em cada uma, recolher o máximo de material, adicionar 100 μ L de acetato de sódio 3 M e agitar;
3. Colocar para incubar a 60 ° C por duas horas, retirar e agitar;
4. Colocar 250 μ L de CIA na capela, agitar até ficar leitoso, agite por 5 minutos;
5. Centrifugar por 10 minutos a 13200 rpm, preparar novos tubos numerados;
6. Transferir 500 μ L de sobrenadante com cuidado, aplicar 500 μ L isopropanol – 20 ° C;
7. Inverter os tubos 10 vezes e colocar no freezer - 20 ° C por uma hora ou mais;
8. Centrifugar por 5 minutos a 7000 rpm, descartar sobrenadante com cuidado na capela;
9. Aplique 500 μ L de álcool 70 % agitando todos os tubos até soltar o pellet, descansar por 5 min, prepare novos tubos numerados para juntar duas subamostras;
10. Centrifugar de 6 em 6 tubos a 13200 rpm por um minuto;
11. Descartar sobrenadante com cuidado, coloque no papel toalha e centrifugue os próximos;
12. Aplicar 300 μ L de NaCl 1 M em cada subamostra dissolvendo tudo, transferir uma subamostra para a outra (600 μ L) e centrifugar a 13200 rpm por 10 minutos;
13. Colocar o sobrenadante no tubo novo e adicionar 600 μ L de isopropanol – 20 ° C, colocar no freezer por uma hora ou mais;
14. Centrifugar por 5 minutos a 7000 rpm, descartar sobrenadante com cuidado na capela;
15. Fazer a lavagem do pellet com 500 μ L de etanol 70 % duas vezes como nos itens 9 a 11;
16. Tirar a RNase do freezer para descongelar;
17. Colocar 500 μ L de etanol 100 % em todos os tubos, agitar e descansar por 5 minutos;
18. Centrifugar 6 tubos a 13200 rpm por um minuto. Descartar o sobrenadante e colocar em papel toalha e pegar os próximos 6 para centrifugar;

19. Deitar os tubos para terminar de secar na capela por meia hora. Enquanto isto, colocar 1,4 μ L de RNase 1mg/ml a cada 1,4 ml de TE para 12 amostras. Prepare novos tubos;
20. Ligar o banho-maria a 37 ° C, aplicar 110 μ L de TE com RNase para dissolver os pellets;
21. Colocar em banho-maria por 1 hora. Centrifugar a 13.200 rpm, por 10 minutos, e transferir 100 μ L de sobrenadante para os novos tubos. Guardar no freezer se não for quantificar no dia;

Com este procedimento, a extração tem duração de até dois dias.

3.2.2. Amplificação e Eletroforese de Microssatélites

Em transferências de primers para outras espécies é esperado que alguns não sejam conservados por ocorrência de mutações nestes sítios genéticos ocasionada pelos processos evolutivos. Por causa destas mesmas mutações os microssatélites podem surgir em outros sítios e com seqüências repetitivas diferentes da espécie original na transferência (PEAKALL *et al*, 1998). Para a amplificação destes marcadores, via PCR, utilizou-se um par de primers (Forward e Reverse) flanqueando a região de seqüências repetitivas, que varia de tamanho e que pode ser observado em géis de poliacrilamida, como variação alélica de comprimentos de DNA. Para cada amplificação, foram utilizados 0,3 μ L de primers na concentração de 10 pmoles/ μ L no mix, que ainda contém dATP, dGTP, dCTP e dTTP, a 100 μ M como concentração final de cada nucleotídeo, uma unidade de Taq polimerase, tampão de reação 1X [20mM Tris (pH 8,4) e 50 mM KCl] com 1,5 mM de MgCl₂ e 01 μ L de DNA, na concentração de 4 ng/ μ L, em um volume total de 10 μ L com água deionizada, sendo protegido com 15 μ L de óleo mineral para não evaporar quando aquecido.

A amplificação foi realizada no termociclador, submetidas a 92° C por 2 minutos para denaturação, 45 ciclos de 1 minuto a 92° C, 1 minuto de 47° C, e 1 minuto a 72° C, e incubando 10 minutos a 72° C para terminar de completar todas as fitas de DNA. Fragmentos gerados por amplificação foram separados de acordo com o tamanho, em corrida, em gel de poliacrilamida (6 %) em 0,5 x TBE [89 mM Tris (pH 8.0), 89 mM de ácido bórico e 5 mM EDTA], usando uma corrente elétrica de 150 V, corado com nitrato de prata e fotografado com câmera digital em um transiluminador.

Foram utilizados 96 primers de outras espécies arbóreas no teste de transferência com um genótipo de *S. adstringens*, para verificar se ocorria amplificação. Os

primers utilizados estão na Tabela 1, dos quais amplificaram-se 48 primers (GAPU11, Sp3, Sp4, Sp5, Sp9, Sp15, Scu039, Scu041, Scu045, Scu049, Scu052, Scu056, Scu062, Scu131, Scu141, EE02, EE15, EE23, EE43, EE45, EE54, EE59, LMCH5, LMCH11, LMCH12, LMCH13, LMCH14, EMBRA3, EMBRA6, EMBRA7, EMBRA12, EMBRA14, EMBRA63, EMBRA72, EMBRA122, EMBRA172, EMBRA210, EMPaS01, EMPaS02, EMPaS04, EMPaS05, EMPaS08, EMPaS11, EMPaS12, EMPaS14, EMPaS15, Cjgsrr7 e Cjgsrr26) que foram então submetidos a avaliação de polimorfismo, com quatro genótipos. Contudo, foram selecionados 10 primers apresentados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Primers de outras espécies transferidos para *Stryphnodendron adstringens* com temperatura de anelamento (T^0) e tamanho de fragmentos (pb).

| PRIMER | FORWARD | REVERSE | PB | T^0 | FONTE |
|----------|--------------------------|------------------------|---------|-------|-------------------------|
| EMBRA03 | GATCGGATTGGAGGAGAC | AATTCAATTCATCCAAAGC | 115-135 | 50 | Brondani et. al., 2002 |
| EMBRA06 | AGAGAATTGCTCTTCATGGA | GAAAAGTCTGCAAAGTCTGC | 125-153 | 54 | Brondani et. al., 2002 |
| EMBRA210 | CGTGTGGTTATGTGAACT | CCTAACAAATGCATAAGCTC | 70-130 | 50 | Brondani et. al., 2002 |
| EMBRA72 | CTGGTCAACGTCCGAAAG | ATGCTGCAGAGGGCATAA | 70-130 | 54 | Brondani et. al., 2002 |
| EMPaS02b | CTACTTCCAATGATTGCCTCAC | AACATCCAGAACATAACACAC | 90-160 | 54 | Vaughan et. al., 2004 |
| LMCH12 | TATCTGCTTGAAACCAAAAC | GCATTAGATGAGAAGGACTC | 50-120 | 58 | Escribano et. al., 2004 |
| LMCH14 | GCTAAGTTCTAGTTTGCAGGTT | CTCCCTCGACACTCTCTCTT | 76-148 | 54 | Escribano et. al., 2004 |
| SCU056TT | CACACAAGCGGGAGTTTTATCA | TACTGTGGGTGGTGGAGTTGAG | 110-130 | 60 | Rosseto et. al.; 1999 |
| SCU062TT | TGGTTGGATCGTTGGCAA | CGCACACCCATTCTCTCTCA | 104-128 | 60 | Rosseto et. al.; 1999 |
| Sp06 | AAGTGGATAGAAATGACAAAAATG | GCGTGGACTAACCATATCAAA | 107-119 | 58 | Kamaus et. al., 2003 |

3.3 Biometria dos Marcadores Microsatélites

3.3.1 Variação Genética

A caracterização da variação genética das populações foi feita através das estimativas das freqüências alélicas e da obtenção dos índices de diversidade usuais.

As freqüências alélicas foram estimadas com o emprego do programa PopGene (YEH e YANG, 1997), utilizando a seguinte expressão:

$$p_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_j} \quad \text{Sendo que:}$$

p_{ij} = estimativa da freqüência do alelo i na população j ;

n_{ij} = número de ocorrências do alelo i na amostra da população j ;

n_j = número total de alelos encontrados na amostra da população.

A heterozigosidade observada (H_o) foi obtida pela média do número de genótipos heterozigotos, em relação ao total de genótipos para cada loco e para as médias dos locos. A heterozigosidade esperada ou mais apropriadamente, a diversidade gênica (H_e), foi estimada pela média das h_e nos locos obtida de acordo com a seguinte expressão, segundo Nei (1978):

$$h_e = \frac{2n(1 - \sum p_i^2)}{(2n - 1)}$$

Onde n = número de indivíduos, e p_i = freqüência do i ésimo alelo.

Os índices de fixação f foram obtidos por:

$$f = \frac{(H_e - H_o)}{H_e}$$

O índice de fixação apresentado é equivalente ao F_{IS} (WRIGHT, 1978). Foram também realizados testes para a diferenciação de populações em termos de freqüências alélicas, para verificar a existência de diferenças significativas entre elas. As análises foram realizadas através do TFGA (MILLER, 1997), onde a hipótese testada supõe que a distribuição das freqüências dos alelos é idêntica nas populações. O programa utiliza a metodologia que emprega reamostragem numérica do tipo Cadeias de Markov.

3.3.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Endogamia de Wright

Os testes de Qui-Quadrado e estatística G foram utilizados para avaliar desvio de panmixia. Para estes testes, foi utilizado o programa TFPGA, disponibilizado por Miller, (1997).

3.3.3 Estrutura Genética

3.3.3.1 Estatísticas F

Para a caracterização da estrutura genética das populações, foram utilizadas as estatísticas F estimadas pelo método de Weir e Cockerham (1984). O método foi escolhido com base no conceito de amostragem aleatória, onde as populações divergiram de um ancestral único, da qual as populações em estudo são amostras aleatórias. Através da análise de variância para cada alelo, foram obtidas estimativas para os coeficientes F , f e θ_p das populações amostradas, sendo que F é o coeficiente de endogamia total, f é o coeficiente de endogamia da população e θ_p é o coeficiente de co-ancestralidade, que mede a endogamia gerada pelo efeito de subdivisão, que é um estimador da divergência entre as populações.

Os coeficientes foram gerados com o emprego do programa GDA (LEWIS e ZAYKIN, 1999), que são equivalentes aos apresentados por Wright (1978), respectivamente para os coeficientes de endogamia total F_{IT} , o coeficiente de endogamia da população F_{IS} e o coeficiente que mede a endogamia gerada pelo efeito de subdivisão F_{ST} do modelo de Wright (1978). Foram estimados os coeficientes para as 5 (cinco) populações de adultos. Distâncias genéticas de Rogers (1972) e Wright (1978) entre populações também foram estimadas, sendo agrupadas pelo método do UPGMA para criar uma árvore de distâncias genéticas utilizando o Programa TFPGA.

3.3.3.2 Fluxo Gênico

Neste trabalho, o fluxo gênico foi considerado sob o conceito proposto por Ellstrand e Elam (1993) para descrever o movimento de genes entre populações diferentes e isoladas espacialmente.

As medidas de fluxo gênico foram feitas mediante duas abordagens indiretas, sendo que a mais tradicionalmente usada proposta inicialmente por Wright (1951), foi baseada na seguinte expressão:

$$m = \left(\frac{1}{4} \right) \cdot \left(\frac{1}{N_e - 1} \right);$$

Sendo N_e = Tamanho efetivo de indivíduos na população;

m = taxa de migração;

As estimativas foram obtidas neste trabalho com o valor de F_{ST} obtido entre as 5 (cinco) populações de Barbatimão e entre as mesmas populações duas a duas com base na expressão apresentada por Slatkin e Barton (1989):

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

As estimativas de fluxo gênico Nm foram realizadas através do programa PopGene.

3.3.3.3 Tamanho Efetivo Populacional

Para o cálculo de tamanho efetivo populacional N_e de cada população considerada isoladamente, utilizou-se a expressão:

$$N_e = \frac{N}{(1 + f)} \quad (\text{VENCOVSKY, 1997})$$

Onde: N = número de indivíduos adultos amostrados;

f = coeficiente de endogamia intrapopulacional.

3.3.3.4 Autocorrelação Espacial

Foram realizadas análises de autocorrelação espacial entre as populações amostradas, com a frequência alélica demarcada para a obtenção de suas coordenadas locais, sendo as variáveis os alelos nas populações.

Para a computação dos dados foi utilizado o programa “Spatial Genetic Software” (SGS) versão 1.0., para obter os índices I de MORAN (SOKAL e ODEN, 1978) para classes de distância para cada alelo, conforme a expressão:

$$I = \left(\frac{n}{W} \right) \cdot \left[\frac{\sum_i \sum_j (p_i - \bar{p})(p_j - \bar{p})W_{ij}}{\sum_i (p_i - \bar{p})^2} \right]$$

Onde:

I = Índice I de MORAN, que pode assumir valores entre $-1,0$ (autocorrelação negativa) e $+1,0$ (autocorrelação positiva)

n = número de indivíduos analisados;

p_i e p_j = frequência alélica nos indivíduos i e j ;

\bar{p} = média de p ;

W_{ij} = elemento da matriz quadrada e simétrica W de dimensões $n \times n$, ao qual é dado o valor 1 para indivíduos vizinhos e 0 nos outros casos.

W = matriz que expressa a relação espacial entre os indivíduos e cuja soma, ao longo de i e j , é igual ao valor W .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amplificação e Eletroforese de Microssatélites

Nas tabelas 2 a 11 estão apresentadas as frequências alélicas dos 10 locos microssatélites estudados, que variaram de 4 alelos (EMBRA 72) a 9 alelos (LMCH 14). Na Tabela 2 o loco EMBRA 03 mostrou 5 alelos, com número efetivo de alelos variando de 2,5 na população de Rubião Junior a 3,4 alelos na população do Bairro Vinte e Quatro de Maio, em Botucatu, indicando uma distribuição ampla de alelos com alta diversidade genética. O mesmo ocorreu também nos outros locos se observarmos o número efetivo destes alelos. Tanto que na média final da Tabela 12 o número médio de alelos nas populações foi de 4,52 e o número efetivo de alelos médio foi de 3,27, com variação desde 3,04 alelos na população do Bairro Vinte e Quatro de Maio em Botucatu a 3,64 alelos na Floresta Estadual de Botucatu. Neste loco não ocorreu desequilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações.

Na Tabela 3 o loco EMBRA 210 apresentou seis alelos com número máximo de alelos por população de cinco alelos com número efetivo variando de 3,7 a 4,5, com desequilíbrio de H-W nas populações dos bairros Vinte e Quatro de Maio e Rubião. Já no loco EMBRA 06 (Tabela 4) variou de cinco a três alelos e número efetivo variando de 2,2 a

3,0 sem desequilíbrio na segregação. Para o loco EMBRA 72 (Tabela 5) a variação ocorreu de três a quatro alelos e número efetivo variando de 2,6 a 3,1 sem desequilíbrio na segregação. Um dos locos que mostrou maior variação de alelos foi o EMPaS 02 (Tabela 6) com três alelos na população de Itu e seis alelos na população do Bairro Rubião, com número efetivo de alelos variando de 2,6 e 5,0 respectivamente, assim como mudanças nas frequências de alelos, embora apenas a população da Floresta Estadual de Botucatu tenha mostrado desequilíbrio de segregação.

Justamente o loco LMCH 14 com o maior número de alelos (Tabela 7) apresentou desequilíbrio de segregação em três populações, também com grande variação de número de alelos entre elas, desde quatro alelos (Bairro Rubião) até oito (Floresta Estadual de Botucatu), com número efetivo de 2,1 e 4,2, respectivamente. O loco LMCH 12 apresentou oito alelos (Tabela 8), o seguinte com maior número e boa variação no número de alelos com quatro nas populações de Avaré e Bairro Vinte e Quatro de Maio até oito alelos na Floresta Estadual de Botucatu, apresentando número efetivo de 1,9, 2,9 e 6,2 respectivamente. Esta última apresentou desequilíbrio na segregação e muita variação de frequências alélicas entre populações.

Na tabela 9 o loco SP 06, por sua vez, mostrou maior uniformidade, como outros locos no início dessa discussão, com pouca variação no número de alelos e no número efetivo de alelos. Na Floresta Estadual de Botucatu também houve desequilíbrio de segregação. Da mesma forma o loco SCU 56 (Tabela 10) foi bastante estável, mas não apresentou desequilíbrio de segregação. O loco SCU 62 (Tabela 11) foi variável no número de alelos, mostrando sete alelos na Floresta Estadual de Botucatu e três alelos em Itu, apresentando número efetivo de 4,2 e 2,9 respectivamente, com desequilíbrio de segregação na Floresta Estadual de Botucatu e Avaré. Este loco também mostrou variação nas frequências de cada população, de modo que existem pequenas diferenças das frequências alélicas dos locos estudados entre as populações.

Tabela 2. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMBRA 03 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,0143 | 0,0000 | 0,0556 | 0,0000 | 0,0000 |
| 2 | 0,4857 | 0,2500 | 0,5000 | 0,4167 | 0,5556 |
| 3 | 0,1000 | 0,0000 | 0,0556 | 0,1667 | 0,0556 |
| 4 | 0,2429 | 0,3125 | 0,2222 | 0,2500 | 0,1667 |
| 5 | 0,1571 | 0,4375 | 0,1667 | 0,1667 | 0,2222 |
| n_a | 5 | 3 | 5 | 4 | 4 |
| n_e | 3,0 | 2,8 | 3 | 3,4 | 2,5 |
| χ^2 | 0,6152 | 0,5007 | 0,7389 | 0,9442 | 0,0989 |
| H_o | 0,4857 | 0,6250 | 0,6667 | 0,5000 | 0,3333 |
| H_e | 0,6702 | 0,6484 | 0,6667 | 0,7083 | 0,6111 |
| H_{nei} | 0,6799 | 0,6917 | 0,7059 | 0,7727 | 0,6471 |
| F_{IS} | 0,2753 | 0,0361 | 0,0000 | 0,2941 | 0,4545 |

Tabela 3. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMBRA 210 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|--------|---------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,1000 | 0,0000 |
| 2 | 0,1471 | 0,2778 | 0,0500 | 0,0000 | 0,0000 |
| 3 | 0,1765 | 0,1111 | 0,3000 | 0,3000 | 0,2778 |
| 4 | 0,3088 | 0,3333 | 0,2000 | 0,3500 | 0,3333 |
| 5 | 0,2353 | 0,1111 | 0,3000 | 0,1000 | 0,2222 |
| 6 | 0,1324 | 0,1667 | 0,1500 | 0,1500 | 0,1667 |
| n_a | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| n_e | 4,5 | 4,1 | 4,1 | 3,9 | 3,7 |
| χ^2 | 0,5429 | 1,0000 | 0,0976 | 0,0136* | 0,0027** |
| H_o | 0,7059 | 0,5556 | 0,4000 | 0,3000 | 0,5556 |
| H_e | 0,7790 | 0,7593 | 0,7550 | 0,7450 | 0,7346 |
| H_{nei} | 0,7906 | 0,8039 | 0,7947 | 0,7842 | 0,7778 |
| F_{IS} | 0,0938 | 0,2683 | 0,4702 | 0,5973 | 0,2437 |

Tabela 4. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMBRA 06 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|---------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,4306 | 0,3500 | 0,2500 | 0,4375 | 0,1875 |
| 2 | 0,0972 | 0,1500 | 0,0000 | 0,1875 | 0,5625 |
| 3 | 0,4444 | 0,4500 | 0,6000 | 0,3125 | 0,1875 |
| 4 | 0,0139 | 0,0500 | 0,1500 | 0,0625 | 0,0625 |
| 5 | 0,0139 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| n_a | 5 | 4 | 3 | 4 | 4 |
| n_e | 2,5 | 2,8 | 2,2 | 3,0 | 2,5 |
| χ^2 | 0,0512 | 0,2129 | 0,4292 | 0,4453 | 0,5007 |
| H_o | 0,4722 | 0,4000 | 0,6000 | 0,6250 | 0,5000 |
| H_e | 0,6073 | 0,6500 | 0,5550 | 0,6719 | 0,6094 |
| H_{nei} | 0,6158 | 0,6842 | 0,5842 | 0,7167 | 0,6500 |
| F_{IS} | 0,2224 | 0,3846 | -0,0811 | 0,0698 | 0,1795 |

Tabela 5. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMBRA 72 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,1719 | 0,2500 | 0,1500 | 0,1667 | 0,3571 |
| 2 | 0,0781 | 0,0000 | 0,1000 | 0,1111 | 0,2143 |
| 3 | 0,3750 | 0,2500 | 0,4500 | 0,1667 | 0,0000 |
| 4 | 0,3750 | 0,5000 | 0,3000 | 0,5556 | 0,4286 |
| n_a | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 |
| n_e | 3,1 | 2,6 | 3,0 | 2,6 | 2,8 |
| χ^2 | 0,0593 | 0,5271 | 0,2129 | 0,0989 | 0,2703 |
| H_o | 0,3125 | 0,4000 | 0,6000 | 0,2222 | 0,4286 |
| H_e | 0,6831 | 0,6250 | 0,6750 | 0,6235 | 0,6429 |
| H_{nei} | 0,6939 | 0,6578 | 0,7105 | 0,6601 | 0,6923 |
| F_{IS} | 0,5425 | 0,3600 | 0,1111 | 0,6436 | 0,3333 |

Tabela 6. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco EMPaS 02, nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0556 | 0,1111 |
| 2 | 0,4091 | 0,1500 | 0,0500 | 0,3333 | 0,1667 |
| 3 | 0,0455 | 0,0000 | 0,1000 | 0,1667 | 0,0556 |
| 4 | 0,4545 | 0,4500 | 0,4500 | 0,0000 | 0,2778 |
| 5 | 0,0909 | 0,4000 | 0,1000 | 0,4444 | 0,2222 |
| 6 | 0,0000 | 0,0000 | 0,3000 | 0,0000 | 0,1667 |
| n_a | 4 | 3 | 5 | 4 | 6 |
| n_e | 2,6 | 2,6 | 3,1 | 2,9 | 5,0 |
| χ^2 | 0,0357* | 0,2129 | 0,2129 | 0,0989 | 0,6117 |
| H_o | 0,3636 | 0,4000 | 0,3000 | 0,4444 | 0,5556 |
| H_e | 0,6157 | 0,6150 | 0,6850 | 0,6605 | 0,8025 |
| H_{nei} | 0,6450 | 0,6474 | 0,7211 | 0,6993 | 0,8497 |
| F_{IS} | 0,4094 | 0,3496 | 0,5620 | 0,3271 | 0,3077 |

Tabela 7. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco LMCH 14 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|---------|--------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,0000 | 0,0000 | 0,1875 | 0,0833 | 0,2000 |
| 2 | 0,0667 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 3 | 0,3833 | 0,2857 | 0,4375 | 0,6667 | 0,4000 |
| 4 | 0,2167 | 0,2857 | 0,1250 | 0,0833 | 0,4000 |
| 5 | 0,0833 | 0,0000 | 0,0625 | 0,0833 | 0,0000 |
| 6 | 0,0333 | 0,0000 | 0,0625 | 0,0000 | 0,0000 |
| 7 | 0,0333 | 0,1429 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 8 | 0,0167 | 0,0000 | 0,0625 | 0,0000 | 0,0000 |
| 9 | 0,1667 | 0,2857 | 0,0625 | 0,0833 | 0,2000 |
| n_a | 8 | 4 | 7 | 5 | 3 |
| n_e | 4,2 | 3,7 | 3,8 | 2,1 | 2,7 |
| χ^2 | 0,0055** | 0,4274 | 0,0349* | 0,5403 | 0,0253* |
| H_o | 0,4000 | 0,7143 | 0,5000 | 0,5000 | 0,0000 |
| H_e | 0,7644 | 0,7347 | 0,7422 | 0,5278 | 0,6400 |
| H_{nei} | 0,7774 | 0,7912 | 0,7917 | 0,5758 | 0,7111 |
| F_{IS} | 0,4767 | 0,0278 | 0,3263 | 0,0526 | 1,0000 |

Tabela 8. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco LMCH 12 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|---------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,1897 | 0,3000 | 0,7000 | 0,5000 | 0,3333 |
| 2 | 0,0690 | 0,1000 | 0,1000 | 0,1429 | 0,0000 |
| 3 | 0,2069 | 0,2500 | 0,1000 | 0,1429 | 0,1667 |
| 4 | 0,1379 | 0,0000 | 0,1000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 5 | 0,1379 | 0,1000 | 0,0000 | 0,2143 | 0,1111 |
| 6 | 0,1897 | 0,1500 | 0,0000 | 0,0000 | 0,3333 |
| 7 | 0,0517 | 0,1000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0556 |
| 8 | 0,0172 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| n_a | 8 | 6 | 4 | 4 | 5 |
| n_e | 6,2 | 4,8 | 1,9 | 2,9 | 3,7 |
| χ^2 | 0,0018** | 0,0976 | 0,3379 | 0,0588 | 0,1336 |
| H_o | 0,5517 | 0,5000 | 0,6000 | 0,5714 | 0,3333 |
| H_e | 0,8395 | 0,7950 | 0,4800 | 0,6633 | 0,7346 |
| H_{nei} | 0,8542 | 0,8368 | 0,5333 | 0,7143 | 0,7778 |
| F_{IS} | 0,3428 | 0,3711 | -0,2500 | 0,1385 | 0,5462 |

Tabela 9. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco SP 06 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|--------|--------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0625 |
| 2 | 0,3750 | 0,2222 | 0,4500 | 0,5000 | 0,4375 |
| 3 | 0,1562 | 0,2222 | 0,3500 | 0,1111 | 0,3125 |
| 4 | 0,4531 | 0,5556 | 0,2000 | 0,3889 | 0,1875 |
| 5 | 0,0156 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| n_a | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| n_e | 2,6 | 2,4 | 2,7 | 2,4 | 3,0 |
| χ^2 | 0,0144** | 0,7642 | 0,2129 | 0,3173 | 0,4453 |
| H_o | 0,3750 | 0,4444 | 0,4000 | 0,3333 | 0,7500 |
| H_e | 0,6294 | 0,5926 | 0,6350 | 0,5864 | 0,6719 |
| H_{nei} | 0,6394 | 0,6275 | 0,6684 | 0,6209 | 0,7167 |
| F_{IS} | 0,4042 | 0,2500 | 0,3701 | 0,4316 | -0,1163 |

Tabela 10. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco SCU 56 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,0135 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 2 | 0,2703 | 0,2000 | 0,1667 | 0,2222 | 0,4000 |
| 3 | 0,1622 | 0,2500 | 0,1667 | 0,2222 | 0,0500 |
| 4 | 0,4730 | 0,1500 | 0,5000 | 0,3889 | 0,2500 |
| 5 | 0,0676 | 0,3500 | 0,1667 | 0,1111 | 0,2500 |
| 6 | 0,0135 | 0,0500 | 0,0000 | 0,0556 | 0,0500 |
| n_a | 6 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| n_e | 3,0 | 4,0 | 3,0 | 3,7 | 3,4 |
| χ^2 | 0,2558 | 0,2814 | 0,3173 | 0,3702 | 0,0651 |
| H_o | 0,5405 | 0,6000 | 0,6667 | 0,4444 | 0,4000 |
| H_e | 0,6720 | 0,7500 | 0,6667 | 0,7346 | 0,7100 |
| H_{nei} | 0,6812 | 0,7895 | 0,7059 | 0,7778 | 0,7474 |
| F_{IS} | 0,1957 | 0,2000 | 0,0000 | 0,3950 | 0,4366 |

Tabela 11. Frequências alélicas, número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade de Nei (1978) (H_{nei}) e índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) do loco SCU 62 nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| Alelo | Populações | | | | |
|-----------|------------|---------|---------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0,0294 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 2 | 0,3529 | 0,3500 | 0,3500 | 0,0500 | 0,3750 |
| 3 | 0,1765 | 0,3000 | 0,0500 | 0,2500 | 0,0625 |
| 4 | 0,2500 | 0,3500 | 0,2000 | 0,4500 | 0,4375 |
| 5 | 0,0882 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2000 | 0,0625 |
| 6 | 0,0735 | 0,0000 | 0,1000 | 0,0500 | 0,0625 |
| 7 | 0,0294 | 0,0000 | 0,3000 | 0,0000 | 0,0000 |
| n_a | 7 | 3 | 5 | 5 | 5 |
| n_e | 4,2 | 2,9 | 3,7 | 3,2 | 2,9 |
| χ^2 | 0,0379* | 0,7545 | 0,0136* | 0,2129 | 0,5007 |
| H_o | 0,4118 | 0,7000 | 0,3000 | 0,5000 | 0,5000 |
| H_e | 0,7669 | 0,6650 | 0,7350 | 0,6900 | 0,6563 |
| H_{nei} | 0,7783 | 0,7000 | 0,7737 | 0,7263 | 0,7000 |
| F_{IS} | 0,4631 | -0,0526 | 0,5918 | 0,2754 | 0,2381 |

4.2 Heterozigosidade, Diversidade Genética e Coeficiente de Endogamia

A heterozigosidade observada entre as populações (Tabela 12) variou de 0,436 no Bairro Rubião a 0,534 em Itu/SP com uma média entre populações de 0,4758, sendo que estudos de locos microssatélites em populações de espécies tropicais mostraram variações de 0,217 a 0,379 em *Antirhea borbonica* (LITRICO *et al.*, 2005) até 0,697 a 0,840 em *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI *et al.*, 2001).

Os resultados encontrados para o *S. adstringens* mostraram valores intermediários de heterozigosidade observada. Como a heterozigosidade esperada foi maior que a observada, os índices de fixação variaram desde 0,2195 na população de Itu até 0,3623 no Bairro de Rubião, com uma média de 0,2914 entre populações, enquanto que na bibliografia de microssatélites encontra-se a variação entre populações de espécies tropicais mostrando valores desde -0,316 a 0,197 em *Eugenia dysenterica* (ZUCCHI *et al.*, 2003) até 0,036 a 0,247 em *Swietenia macrophylla* (NOVICK *et al.*, 2003). Os valores do barbatimão foram altos, talvez por ocorrer autofecundação ou cruzamento entre parentes, o que levou a um tamanho efetivo variando de 73,41, no Bairro Rubião, até 82,64, em Avaré, com média de 77,63, necessitando, portanto, de uma coleta mais ampla para completar os 100 representantes da espécie.

A heterozigosidade de Nei (1978) é utilizada para medir diversidade genética em plantas autógamas com base na diversidade alélica das populações. Neste trabalho o índice variou de 0,699, em Avaré, até 0,727, no Bairro Rubião. Estes valores indicam boa diversidade nas populações junto com os valores de número efetivo de alelos em relação ao número de alelos total, embora exista um componente alto de endogamia que pode ser uma característica própria de *S. adstringens*.

Outro fato que indica alta diversidade genética é a porcentagem de locos polimórficos nas populações que sempre foi de 100%, fato este que não se observa em outras espécies (COLLEVATTI *et al.*, 2001; LITRICO *et al.*, 2005; NOVICK *et al.*, 2003; ZUCCHI *et al.*, 2003). O *S. adstringens* é uma espécie com estrutura de diversidade muito característica.

Tabela 12. Número de alelos (n_a), número efetivo de alelos (n_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade ou diversidade genética de Nei (1978) (H_{nei}), porcentagem de locos polimórficos (P), índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}) e tamanho efetivo (N_e) com base em 100 indivíduos para todos os locos nas populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| | Populações | | | | | Média |
|------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| n_a | 5,6000 | 3,9000 | 4,5000 | 4,3000 | 4,3000 | 4,5200 |
| n_e | 3,6372 | 3,3206 | 3,0896 | 3,0497 | 3,2712 | 3,2737 |
| H_o | 0,4619 | 0,5339 | 0,5033 | 0,4441 | 0,4356 | 0,4758 |
| H_e | 0,7027 | 0,6835 | 0,6596 | 0,6611 | 0,6813 | 0,6776 |
| H_{nei} | 0,7156 | 0,7230 | 0,6989 | 0,7048 | 0,7270 | 0,7139 |
| F_{IS} | 0,3426 | 0,2195 | 0,2100 | 0,3225 | 0,3623 | 0,2914 |
| N_{e100} | 74,48 | 82,00 | 82,64 | 75,61 | 73,41 | 77,63 |

4.2.1 Estatística F e Distâncias Genéticas

Pelo método de Weir e Cockerham (1984) foram obtidas as estimativas de coeficiente de endogamia total (F) de 0,3623, endogamia entre populações (θp) de 0,0145 e coeficiente de endogamia da população (f) de 0,3529 (Tabela 13), com pequenos desvios em cada loco estudado. Apenas os valores de F e f foram diferentes de zero a 95 % de probabilidade, significando que a maior parte da diversidade genética está dentro das populações, não havendo isolamento e deriva genética entre elas.

Tabela 13. Réplicas com eliminação sequencial de loco das estimativas de coeficiente de endogamia total (F), endogamia entre populações (θp) e coeficiente de endogamia da população (f) de Weir & Cockerham (1984), com suas médias, desvio padrão e intervalo de 1000 reamostragens com limite superior e inferior a 95% de probabilidade.

| Replica | F | θp | f |
|----------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| 1 | 0,3727 | 0,0176 | 0,3615 |
| 2 | 0,3723 | 0,0179 | 0,3609 |
| 3 | 0,3724 | 0,0106 | 0,3656 |
| 4 | 0,3503 | 0,0158 | 0,3399 |
| 5 | 0,3482 | 0,0073 | 0,3434 |
| 6 | 0,3535 | 0,0175 | 0,3420 |
| 7 | 0,3608 | 0,0144 | 0,3514 |
| 8 | 0,3628 | 0,0152 | 0,3529 |
| 9 | 0,3715 | 0,0141 | 0,3625 |
| 10 | 0,3564 | 0,0138 | 0,3474 |
| Média | 0,3623 | 0,0145 | 0,3529 |
| Desvio | 0,0277 | 0,0095 | 0,0269 |
| Superior | 0,4145 | 0,0334 | 0,4027 |
| Inferior | 0,3114 | -0,0012 | 0,3006 |

Por outro lado o método de Wright (1978) (Tabela 14) detectou uma pequena endogamia entre as populações, assim como o teste de qui-quadrado nos locos EMBRA 06, EMPaS 02 e SCU 062. Este método foi mais sensível mesmo porque constatou-se nas frequências alélicas das Tabelas 2 a 11 alguma variação visível. Os valores de endogamia total (F_{IT}) foi de 0,3475, a endogamia dentro de população (F_{IS}) de 0,2979 e a endogamia entre populações (F_{ST}) de 0,0696.

Comparando com a bibliografia o valor de θ p entre populações, parâmetro equivalente ao F_{ST} de Wright (1978), de *S. adstringens* foi abaixo do que o encontrado para espécies tropicais como é o caso da *Swietenia macrophylla* (0,097) (Lemes *et al.*, 2003) e da *Symphonia globulifera* (0,031) (Aldrich *et al.*, 1998). Consultando trabalhos de microssatélites com estes coeficientes, verificou-se que *Eugenia dysenterica* (Zucchi *et al.*, 2003) mostrou uma estrutura diferente ($F_{IS} = -0,017$, $F_{IT} = 0,238$ e $F_{ST} = 0,250$), sendo F_{IS} não significativamente diferente de zero embora também seja uma espécie do cerrado. O F_{ST} igual a 0,0696 significa que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações (93,04%) e existe pouca variação entre populações de *S. adstringens* (6,96%). O fluxo gênico histórico ($Nm = 3,3430$) também mostra a mesma tendência.

Para *S. adstringens* deve ocorrer predação das sementes e dispersão complexa que não permite estabelecimento de genótipos aparentados nas proximidades, tanto que nessa pesquisa foi observado um grande ataque às sementes por insetos e fungos que até dificultaram as coletas. Além disso, não foram observadas plântulas germinando embaixo da planta mãe, enquanto que plantas novas sempre estavam distantes ao menos dez metros em áreas onde ainda não havia plantas adultas. Talvez as sementes sejam apenas para realizar colonização de novas áreas, de modo que, se isto ocorre, a diversidade genética tende a ser alta mesmo com alguma taxa de endogamia nos cruzamentos, pois os indivíduos colonizadores devem ter vindo de diversas matrizes trazidas por dispersores.

Tabela 14. Endogamia total (Fit), endogamia dentro de população (Fis), probabilidade de qui-quadrado de frequências alélicas entre populações (χ^2) e endogamia pela divisão entre populações (Fst) de Wright (1978).

| Locus | Fit | Fis | χ^2 | Fst | Nm |
|--------------|---------------|---------------|----------------------------|---------------|---------------|
| EMBRA 03 | 0,2423 | 0,2100 | 0,6118 | 0,0409 | 5,8638 |
| EMBRA 210 | 0,3564 | 0,3329 | 0,0735 | 0,0353 | 6,8269 |
| EMBRA 06 | 0,2438 | 0,1604 | 0,0023** | 0,0993 | 2,2689 |
| EMBRA 72 | 0,4340 | 0,3958 | 0,1387 | 0,0632 | 3,7084 |
| EMPaS 02 | 0,4610 | 0,3892 | 0,0001** | 0,1175 | 1,8771 |
| LMCH 14 | 0,4242 | 0,3798 | 0,1595 | 0,0716 | 3,2408 |
| LMCH 12 | 0,3314 | 0,2721 | 0,2427 | 0,0814 | 2,8224 |
| SP 06 | 0,3040 | 0,2608 | 0,1891 | 0,0584 | 4,0289 |
| SCU 056 | 0,2896 | 0,2495 | 0,2046 | 0,0534 | 4,4284 |
| SCU 062 | 0,3636 | 0,3135 | 0,0010** | 0,0731 | 3,1721 |
| Média | 0,3475 | 0,2979 | | 0,0696 | 3,3430 |

Distâncias genéticas também são auxiliares no estudo da estrutura genética das populações. Para o *S. adstringens* as distâncias obtidas por Rogers (1972) e Wright (1978), são apresentadas na Tabela 15, cujos valores não foram muito elevados, mostrando-se muito semelhantes entre eles, embora o menor valor de 0,1819 está entre Floresta Estadual de Botucatu e Itu, enquanto que a maior de 0,2796 foi entre Avaré e Itu, nos procedimentos de Rogers (1972). Posições semelhantes são encontradas quando se utilizou Wright (1978), com valores um pouco maiores e com consistências de nós melhores que Rogers (1972) (Figura 6). Curiosamente a Floresta Estadual de Botucatu e Itu ficaram agrupadas pelo UPGMA enquanto que os Bairros Rubião e Vinte e Quatro de Maio ficaram mais distantes geneticamente, embora geograficamente estejam próximos. No entanto, os valores estimados não são tão discrepantes.

Tabela 15. Distâncias genéticas de Wright (1978) abaixo da diagonal e de ROGERS (1972) acima da diagonal entre as populações da Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5)..

| População | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | ***** | 0,1819 | 0,1958 | 0,1996 | 0,2272 |
| 2 | 0,1970 | ***** | 0,2796 | 0,2448 | 0,2551 |
| 3 | 0,2229 | 0,2832 | ***** | 0,2502 | 0,2464 |
| 4 | 0,2254 | 0,2570 | 0,2759 | ***** | 0,2444 |
| 5 | 0,2440 | 0,2612 | 0,2810 | 0,2546 | ***** |

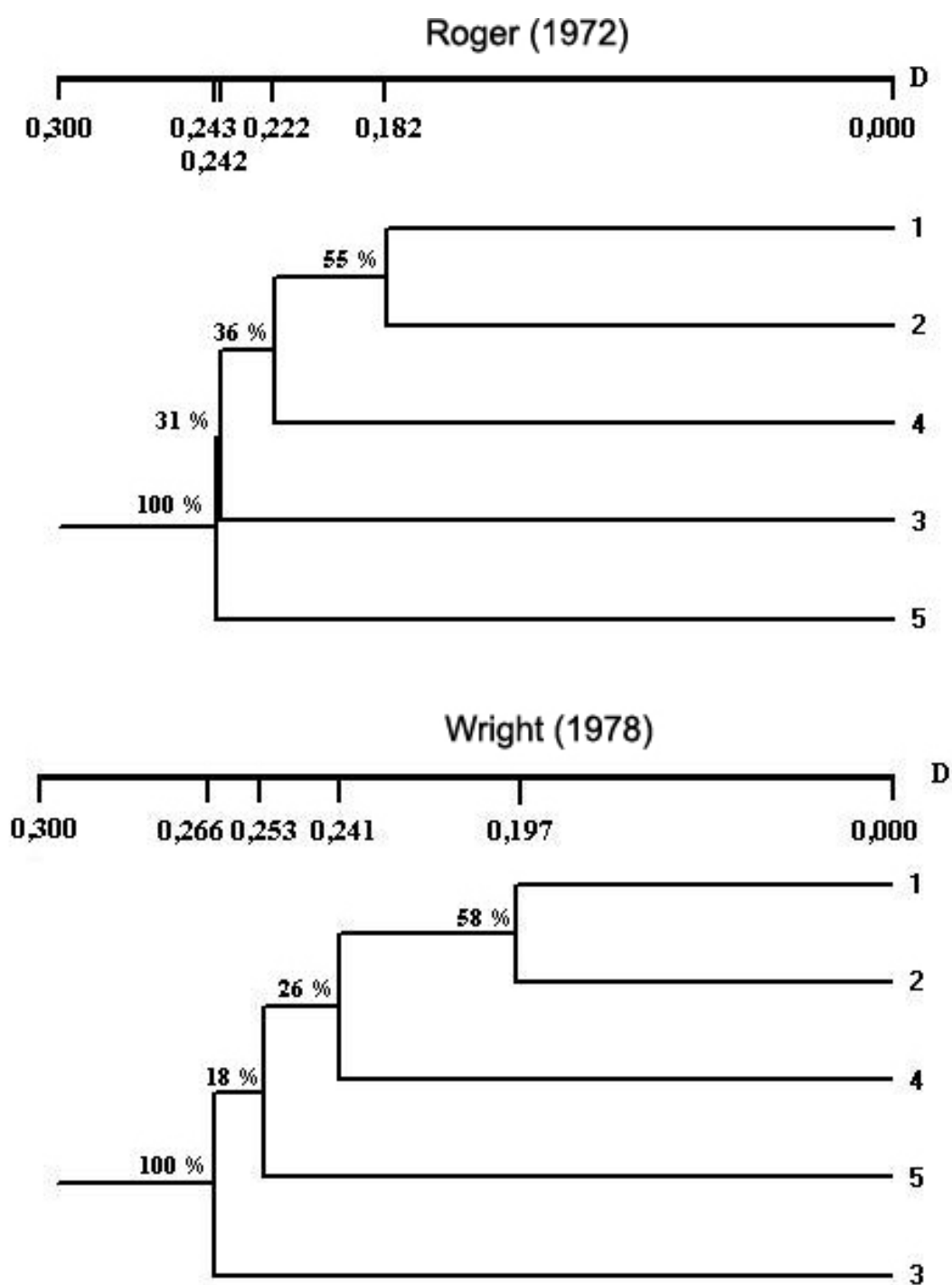


Figura 6. Dendrograma de distâncias de Rogers (1972) e de Wright (1978) pelo método de UPGMA e consistências dos nós obtidas por 1000 reamostragens entre as populações da Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

Tabela 16. Endogamia (Fst) acima da diagonal e fluxo gênico (Nm) abaixo da diagonal ocorrendo entre as populações Floresta Estadual de Botucatu (1), Itu (2), Avaré (3), Bairro Vinte e Quatro de Maio (4) e Bairro Rubião (5).

| População | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | ***** | 0,0269 | 0,0361 | 0,0363 | 0,0405 |
| 2 | 9,0279 | ***** | 0,0565 | 0,0468 | 0,0476 |
| 3 | 6,6837 | 4,1729 | ***** | 0,0544 | 0,0557 |
| 4 | 6,6461 | 5,0877 | 4,3435 | ***** | 0,0461 |
| 5 | 5,9211 | 4,9982 | 4,2352 | 5,1749 | ***** |

Estes resultados indicam que as distâncias entre populações não estão relacionadas com diferenças genéticas em *S. adstringens*, evidenciando uma estratégia genética própria da espécie. Muitos estudos de predação, dispersão e estabelecimento de plantas devem ser realizados se possível com acompanhamento de marcadores moleculares.

4.2.2 Autocorrelação Espacial e Reprodução Vegetativa

Entre populações a distância não parece influir nos resultados, então estudou-se o efeito de distância dentro de população em 38 plantas da Floresta Estadual de Botucatu com um correlograma do Índice de Moran que está na Figura 7. Neste correlograma observou-se que o índice só foi significativo a 95 %, na primeira classe de 30 m de distância; ainda assim, com um índice pequeno de 0,0413 (Tabela 17), apontando talvez para um pequeno grau de parentesco nesta proximidade, corroborando as suposições de que a estratégia da espécie é a dispersão a longas distâncias e não estabelecimento ao lado das plantas mães, sendo as sementes, provavelmente, o instrumento de colonização e não de substituição da mortalidade da espécie, na mesma área.

Aproveitando o levantamento visual das plantas, foi observado se estava ocorrendo reprodução assexuada na espécie. No entanto, não foram encontrados indivíduos semelhantes lado a lado e nem mesmo a pequenas distâncias. Esta também é uma estratégia de sobrevivência de espécies de Cerrado, via subterrânea, porém não foi o observado na área. O que se observa é uma árvore ao ser derrubada, logo ao lado saem novos brotos a partir do colo da planta em substituição à árvore morta, sem, no entanto, ocorrer caminhamento. É muito comum encontrar árvores bifurcadas logo ao nível do solo, provavelmente resultado da rebrota de um indivíduo arbóreo no local. Logo, a *S. adstringens* tem um sistema de regenerar a parte aérea utilizando-seda parte subterrânea, mas a semente ainda é a ferramenta de colonização.

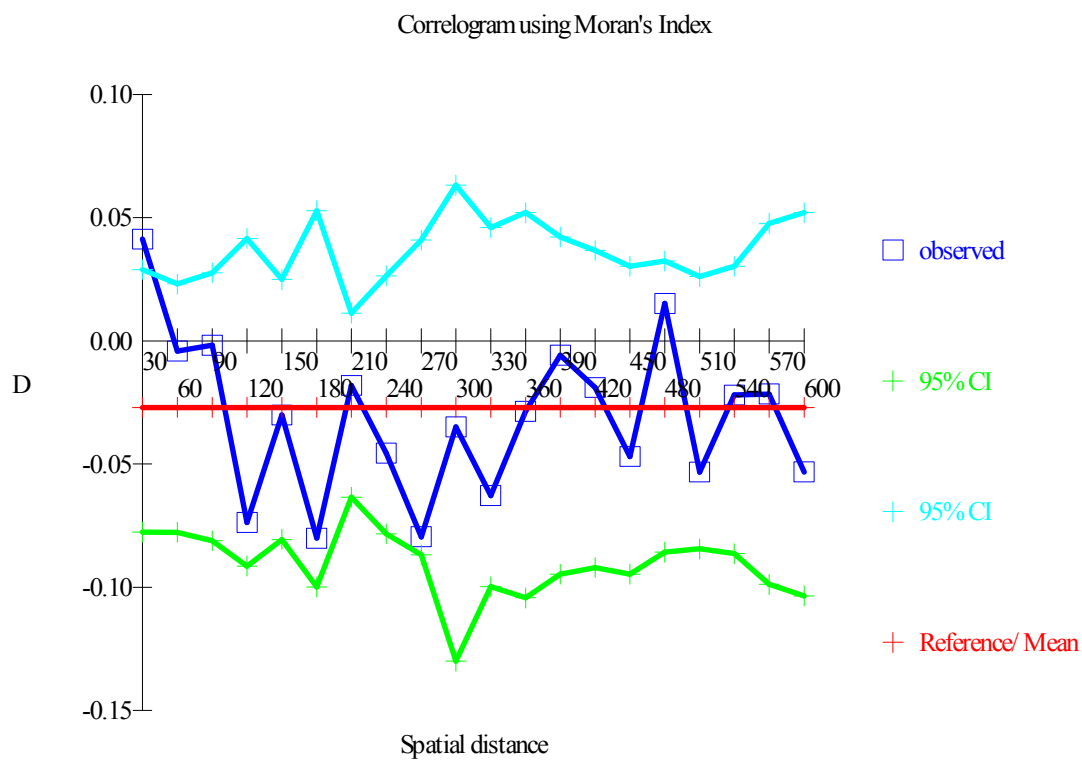


Figura 7. Correlograma utilizando o índice de MORAN (D) entre diferentes distâncias de plantas de *Stryphnodendron adstringens* na Floresta Estadual de Botucatu e o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Tabela 17. Dados do Índice de MORAN (D) intervalo de confiança (IC) e probabilidade (P) a cada classe de distância entre plantas de Barbatimão. Floresta de Botucatu.

| Distância (m) | D(- CI) | D(obs.) | D(+ CI) | P(D)<(-CI) | P(D)>(+ CI) |
|---------------|---------|---------|---------|------------|--------------|
| 0-30 | -0,0788 | 0,0413 | 0,0332 | 0,0100 | 0,9900 |
| 30-60 | -0,0790 | -0,0041 | 0,0190 | 0,1540 | 0,8460 |
| 60-90 | -0,0844 | -0,0017 | 0,0259 | 0,1700 | 0,8300 |
| 90-120 | -0,0869 | -0,0737 | 0,0329 | 0,9380 | 0,0620 |
| 120-150 | -0,0770 | -0,0301 | 0,0230 | 0,5160 | 0,4840 |
| 150-180 | -0,1022 | -0,0800 | 0,0506 | 0,9080 | 0,0920 |
| 180-210 | -0,0627 | -0,0181 | 0,0089 | 0,3000 | 0,7000 |
| 210-240 | -0,0789 | -0,0456 | 0,0242 | 0,7820 | 0,2180 |
| 240-270 | -0,1007 | -0,0795 | 0,0341 | 0,9380 | 0,0620 |
| 270-300 | -0,1265 | -0,0349 | 0,0650 | 0,5420 | 0,4580 |
| 300-330 | -0,1011 | -0,0628 | 0,0422 | 0,8360 | 0,1640 |
| 330-360 | -0,0913 | -0,0286 | 0,0462 | 0,5340 | 0,4660 |
| 360-390 | -0,0914 | -0,0058 | 0,0457 | 0,3160 | 0,6840 |
| 390-420 | -0,0923 | -0,0189 | 0,0465 | 0,3620 | 0,6380 |
| 420-450 | -0,0811 | -0,0469 | 0,0429 | 0,7560 | 0,2440 |
| 450-480 | -0,0833 | 0,0152 | 0,0359 | 0,0980 | 0,9020 |
| 480-510 | -0,0809 | -0,0532 | 0,0168 | 0,8300 | 0,1700 |
| 510-540 | -0,0807 | -0,0220 | 0,0286 | 0,4200 | 0,5800 |
| 540-570 | -0,0963 | -0,0215 | 0,0461 | 0,4460 | 0,5540 |
| 570-600 | -0,1065 | -0,0532 | 0,0542 | 0,7400 | 0,2600 |

5. CONCLUSÕES

As populações estudadas apresentaram variabilidade genética inter e intrapopulacionais, sendo que o maior percentual deu-se dentro das populações ao nível de 98,55%.

As populações estudadas apresentaram menor quantidade de heterozigose observada quando comparada à esperada mostrando a existência de endogamia nas populações.

A distribuição espacial das plantas estudadas mostrou inexistirem muitos indivíduos aparentados ocorrendo em proximidades, como quantifica o Índice de MORAN ($I=0,0413$).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGA, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 933-944, 1998.

ALMEIDA, S. P.; SANO, S. M. Cerrado: espécies vegetais úteis. Brasília: EMBRAPA Cerrado, 1998,. p. 347-351.

ALVAREZ-BUYLLA,E.R.; GARCÍA-BARROS, R.; LARA-MORENO,C. & MARTINEZ-RAMOS,M. 1996a. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest trees species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 387 - 421.

ALVAREZ-BUYLLA,E.R.; CHAOS, A.; PIÑERO, D. & GARAY, A. 1996b. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal and seed banks. *Evolution* 50: 1155 – 1166.

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

ANDRÉ, T. 2005. Fluxo Gênico e Diversidade genética em uma população manejada de mogno (*Swietenia macrophylla*, KING, Meliaceae) na Amazônia Oriental. Manaus: INPA/UFAM, 2005. p. 46. Dissertação de Mestrado.

ASSUNÇÃO, S.L. & FELFILI, J.M. Fitossociologia de um fragmento de cerrado *sensu stricto* na APA do Paranoá, DF, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*. V.18, n.4, 2004.

BARREIRA *et. al.*. Efeitos de diferentes intensidades de corte seletivo sobre a regeneração natural do Cerrado. *Cerne*, v.6, n.1, p.040-051, 2000.

BARROS, M.A.G. Flora medicinal do Distrito Federal. *Brasil Florestal*. V. 12, n.50, p.35-45, 1982.

BORÉM, A. Melhoramento de plantas. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 1998. 453p.

BRONDANI, R.P.V; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for Eucalyptus based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Mol Genet Genomics* (2002) 267: 338-347.

CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELL, R. & BAWA, K.S. 1996. Distant gene flow in tropical trees. *Nature* 383: 398 - 399.

CLEMENT, C.R.; HIGUCHI, N. A floresta amazônica e o futuro do Brasil. *Amazônia Artigos*, p.44-49, 2006.

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*, v. 10, p. 349-356, 2001.

CONDIT, R. & HUBBELL, S. P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 6. ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. v. B 1. 1978, 590 p.

CRUZ, G. L. Livro verde das plantas medicinais, industriais, comestíveis, tóxicas e venenosas: suas curiosidades históricas e lendas. Belo Horizonte, 1965.

DURIGAN, G. Bases e diretrizes para a restauração da vegetação do Cerrado. Cap. 8. Restauração ecológica de ecossistemas naturais. 2008, 340p.

ELISABETSKY, E. Plantas medicinais – Uso Popular na Reserva Extrativista “Chico Mendes” - Acre., 165p, 1997.

ELLSTRAND, N.; ELAM, D. Population genetic consequences of small population size: Implication for plant conservation. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 24, p. 217-242, 1993.

ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M. A.; HORMAZA, J. I. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* MILL., Annonaceae) Molecular Ecology Notes, v.4, p. 746-748, 2004.

FELFILI, J.M., SILVA JÚNIOR, M.C., REZENDE, A.V., MACHADO, J.W.B., WALTER, B.M.T., SILVA, P.E.N. & HAY, J.D. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado sensu stricto da Chapada Pratinha, Brasil. Acta bot. Brás, v. 6, v. 27-46, 1993.

FELFILI, J. M. *et al.* Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. Revista Brasileira de Botânica. v. 22, n. 1, p. 83-90, 1999.

FELFILI, J.M. & BORGES FILHO, H.C., Extrativismo racional da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal, 2004. 32 p.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA, CENERGEN, P.220, 1995.

FREITAS C. V. & OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasil. Bot.*, V.25, n.3, p.311-321, set. 2002.

FUTUYMA, D.J. (1979). *Evolutionary biology*. Sunderland, MA: Sinauer.

GIBBS, P.E. & SASSAKI, R. 1998. Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae- Papilionoideae) in SE Brazil: the effect of pistillate sorting on fruit-set. *Annals of Botany* 81:735-740.

GLASENAPP, J. S. Estrutura genética e fenóis totais de populações naturais de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). Dissertação de Mestrado. Viçosa, 2007. 74p.

GOODLAND, R.; FERRI, M.G. *Ecologia do cerrado*. Belo Horizonte: Itatiaia, 1979. 193p. (Reconquista do Brasil, 52).

HIRSCHMANN, G.S. & ARIAS, A.R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, Limeick, v.29, p.159-172, 1990.

IBGE. <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 01/set/2010.

INDEX. *Kewensis Plantarum Phanerogamarum* (1931-5), London, Oxford Univ, supl. 9, 1958, p.270.

JACOBSON *et.al.* Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.

KAMAUS, E.M.; MAYES, S.; BARRETA, A.B. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Schizolobium parahyba* (Leguminosae). *Molecular Ecology Notes* (2003) 3, 469-470

KONUMA, A.; TSUMURA, Y.; LEE, C.T.; LEE, S.L. & OKUDA, T. 2000. Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. *Molecular Ecology* 9: 1843 – 1852.

- LACY, R.C. 1986. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology* 1: 143 - 158.
- 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*, v. 12, p. 2875-2883, 2003.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). Free program distributed by the authors over the internet from the GDA Home Page at <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/1999>.
- LITRICO, I.; RONFORT, J.; VERLAQUES, R.; THOMPSON, J.D. Spatial structure of genetic variation and primary succession in the pioneer tree species *Antirhea borbonica* on La Reunion. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 1575-1584, 2005.
- LITT, M & LUTTY, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle of actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397 - 401.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum, Nova Odessa, 1992, 254 p.
- MILLER, M.P. Tools for population genetic analysis (TGFP). 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author. 1997.
- MORGANTE, M. & OLIVIERI, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182.
- NASON, J. D. 2002. La estructura genética de las poblaciones de árboles. In: Manuel R. Guariguata; Gustavo Kattan (Ed.), *Ecología y conservación de bosques neotropicales*: 299-327. Cartago, Costa Rica: Ediciones LUR.

- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 89, p. 583-590, 1978.
- NOVICK, R.R.; DICK, C.W.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 2885-2893, 2003.
- OCCHIONI, E.M. de LAMARE. Considerações taxonômicas no Gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae – Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Botânica Brasilica* v. 4, n. 2, p. 153-158, 1990.
- OLIVEIRA, P.E. The pollination and reproductive biology of a cerrado woody community in Brazil. Ph.D. thesis, University of St. Andrews, St. Andrews, 1991, 156 p.
- OLIVEIRA, P.E. & GIBBS, P.E. 2000. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of Central Brazil. *Flora* 195:311-329.
- OLIVEIRA, P.E. & SILVA, J.C.S. 1993. Reproductive biology of two species of *Kielmeyera* (Guttiferae) in the cerrados of central Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 9:67-79.
- ORTIZ, P.L.; ARISTA, M.; OLIVEIRA, P.E.; TALAVERA, S. Pattern of flower and fruit production in *Stryphnodendron adstringens*, an andromonoecious legume tree of Central Brazil. *Plant Biology*, v.5, p.592-599, 2003.
- PEARSE, D.E. & CRANDALL, K.A. 2004. Beyond Fst: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5: 585 – 602.
- PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M. e RAFALSKI, A. Cross species amplification of Soybean (*Glycine max*) simple-sequence-repeats (SSRs) within the genera and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol*, v. 15, p. 1275-1287, 1998.

PEREIRA, C. A. Plantas tóxicas e intoxicações na veterinária. Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 1992, 279 p.

PIO CORRÊA, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Oficial, 1926. V.1. 1474 p.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1: 215-222.

PRIMO, B. L. Riqueza tanífera de alguns produtos vegetais brasileiros. An Assoc. Quim. Brás. 4 (2): 117-120, 1945.

RAFALSKI, J. A., VOGEL, J. M., MORGANTE, M., POWELL, W, ANDRE, C. & TINGEY, S. V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: *Analysis of Nonmammalian Genomes - a practical guide* (eds Birren, B & Lai, E.) pp 75 - 134. Academic Press, New York.

RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* 80:223-230.

RIZZINI, C. T. & W. B. MORS. Botânica econômica brasileira. Edusp, São Paulo. 1976, 227p.

RODRIGUES, J. B. *Hortus fluminensis*, p.154-155, 1893.

ROGERS, J. S. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics VIZ. Univ. of Texas Publ.*, v. 7213: p. 145-153, 1972.

ROSSETO, M., McLAUHLAN, A., HARRIS, F.C.L., HENRY, R.J., BAVERSTOCK, P.R., LEE, L.S., MAGUIRE, T.L., EDWARDS, K.J. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae).

SANO, S. M. & ALMEIDA, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1998. 556p.

SARAIVA, L.C., CESAR, O. & MONTEIRO, R. 1996. Breeding systems of shrubs and trees of a Brazilian savanna. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 39:751-763.

SCALLO, V. R., Revisão taxonômica do gênero *Stryphnodendron* MART. (Leguminosae-Mimosoideae). Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2007.

SLATKIN, M.; BARTON, N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, v. 43, p. 1349-1368, 1989.

SLATKIN, M. Gene flow and population structure. In: REAL, L.A. (ed.) *Ecological Genetics*. Princeton University Press. New Jersey, 1994, p.3-17.

SILVA, J. M. Avaliação da variabilidade genética em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. para fins de conservação e melhoramento genético / Janete Motta da Silva. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2010 153 f. : il.

SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biological Journal of the Linnaean Society*, v. 10, p. 229-249, 1978.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). *Recursos genéticos e melhoramento – plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.939-966.

SOUZA, C. D. & FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO. Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, v.20, n.1, p.135-142, 2006.

TAUTZ, D. & RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127- 4138.

VAUGHAN, S.P.; RUSSEL, K., Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular Ecology Notes*, v.4, p. 429-431, 2004.

VELLOZO, J.M.C. *Flora fluminensis*, Rio de Janeiro, s.c.p., 1970, v.11, t.7.

VENCOVSKY, R. Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size. In: International Workshop on Agricultural Biotechnology. Proceedings. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997, p. 21-22.

WEIR, B.S. Genetic Data Analysis. Sunderland: Sinauer Associates, inc., 1990, 445 p.

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

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, v. 15, p. 323-354, 1951.

WRIGHT, S.. *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol 4. Variability Within and Among Populations. Chicago University Press, Chicago, IL, 256 p.,1978.

YEH, F. C.; YANG, R. POPGENE version 1.20, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. July, 1997.

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*, v. 26, n. 4, p. 229-457, 2003.