

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

**Diversidade genética de *Qualea grandiflora* Mart estimada por
microsatélites em quatro áreas de Cerrado do estado de São Paulo**

Lia Maris Orth Ritter

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

**Piracicaba
2012**

Lia Maris Orth Ritter
Bióloga

**Diversidade genética de *Qualea grandiflora* Mart estimada por microssatélites em
quatro áreas de Cerrado do estado de São Paulo**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2012**

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

Ritter, Lia Maris Orth

Diversidade genética de *Qualea grandiflora* Mart estimada por microssatélites em quatro áreas de Cerrado do estado de São Paulo / Lia Maris Orth Ritter.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
101 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cerrado 2. Diversidade genética 3. Fanerógamas 4. Fluxo gênico 5. Marcador molecular 6. Reprodução vegetal I. Título

CDD 581.5264
R547d

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

DEDICO

À minha família, que participou
fielmente de todos os passos que me
levaram a esta conquista.

Ao meu amor, Lucas Antiqueira.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Yoshio Kageyama, pela orientação e oportunidade de fazer parte de sua equipe de trabalho no LARGEA.

Ao Instituto Florestal pela permissão para realizar coletas e por disponibilizar seus funcionários para auxiliarem em campo. À FAPESP pelo financiamento do projeto temático e pela bolsa de doutorado (Processo 2008/06834-2).

Aos colegas e professores que participaram do projeto temático “Estrutura genética e sistema reprodutivo de espécies arbóreas do Cerrado do estado de São Paulo”, especialmente Roberto Tarazi, Flávio Bertin Gandara, Maria Andréia Moreno, Renata Souza e Bruna Ibanes, pelas sugestões e auxílio nas atividades de campo, laboratório e análise de dados. À professora Sybelle Barreira por toda atenção dispensada desde a concepção do projeto até a análise dos resultados, mas principalmente por sua amizade e seus conselhos sempre valiosos.

A toda equipe técnica do LARGEA, especialmente Elza Martins Ferraz por coordenar as atividades de campo e laboratório e Maria Andréia Moreno por todo apoio técnico do início ao fim dos trabalhos, inclusive em horários fora de seu expediente, mas acima de tudo, por sua amizade. Aos colegas de pós-graduação com quem dividi as bancadas do Largea no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Chico, Eric, Vinícius, Eurípedes, Furlan e Buza pelo auxílio nas atividades de campo. Aos demais técnicos das Unidades de Conservação pelas caronas e reboques em meio aos atoleiros. Ao Miklos Bajay pela colaboração no tratamento de dados.

Aos meus amigos de Porto União, Ponta Grossa e da ESALQ, pelos bons momentos passados juntos, especialmente à Micheli Horbach, por ser uma grande companheira em todas as ocasiões. À Renata Gabriela (Linguíça), por todas as viagens, trabalhos de campo, noites sombrias nos alojamentos, por todos os sanduíches que dividimos em meio ao Cerrado. Por cada sorriso e cada lágrima que derramamos enquanto errávamos e acertávamos juntas em nossos trabalhos e, sobretudo pela amizade sincera que construímos nestes anos.

Aos meus pais (Nelci e Irineu), meus irmãos (Rodrigo e Diego), minha tia e segunda mãe (Elfrida) e em memória de meu tio Léo Nicolau Orth.

Ao meu amor, Lucas Antikeira, razão do meu sorriso, meu companheiro para toda a vida, para o qual faltam as palavras e sobram os sentimentos.

E finalmente, mas não menos importante, a Deus, por me presentear com saúde, proteção e uma fé inabalável que me permitiu lutar pelos meus ideais sem desistir, mesmo quando tropecei.

Posso todas as coisas Naquele que me fortalece.

(Filipenses 4.13)

Que ninguém se engane: só se consegue a simplicidade através de muito trabalho.

(Clarice Lispector)

SUMÁRIO

	RESUMO.....	11
	ABSTRACT.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Objetivos.....	16
1.2	Revisão Bibliográfica.....	16
1.2.1	O Cerrado.....	16
1.2.2	Estrutura e diversidade genética.....	19
1.2.3	Fluxo gênico em populações naturais.....	21
1.2.4	Espécie de estudo.....	21
1.2.5	Áreas de estudo.....	24
	Referências.....	27
2	O USO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO DO CERRADO.....	33
	Resumo.....	33
	Abstract.....	33
2.1	Introdução.....	33
2.2	Marcadores Moleculares Microsatélites.....	34
2.3	Aplicação de marcadores microsatélites em estudos no Cerrado brasileiro.....	36
2.4	Considerações Finais.....	38
	Referências.....	38
3	DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>QUALEA GRANDIFLORA</i> MART (VOCHYSIACEAE), ESPÉCIE TÍPICA DO CERRADO BRASILEIRO.....	43
	Resumo.....	43
	Abstract.....	43
3.1	Introdução.....	43
3.2	Material e Métodos.....	44
3.3	Resultados.....	48
3.4	Considerações Finais.....	49
	Referências.....	51
4	ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE	

QUALEA GRANDIFLORA MART NO CERRADO DO ESTADO DE SÃO PAULO.....	53
Resumo.....	53
Abstract.....	53
4.1 Introdução.....	54
4.2 Material e Métodos.....	55
4.2.1 Áreas de estudo e amostragem.....	55
4.2.2 Extração de DNA e análises genéticas.....	58
4.2.3 Análise de dados.....	58
4.3 Resultados e Discussão.....	61
4.3.1 Distribuição espacial e classes diamétricas.....	61
4.3.2 Diversidade genética.....	64
4.3.3 Estrutura genética espacial.....	68
4.3.4 Correção do índice de fixação para o efeito Wahlund.....	70
4.3.5 Tamanho efetivo e área mínima viável.....	73
4.3.6 Fluxo gênico aparente.....	74
4.3.7 Gargalos genéticos.....	76
4.4 Considerações Finais.....	77
Referências.....	78
5 SISTEMA REPRODUTIVO E FLUXO DE POLEN EM PROGÊNIES DE QUALEA GRANDIFLORA MART EM ASSIS, SP.....	85
Resumo.....	85
Abstract.....	85
5.1 Introdução.....	86
5.2 Material e Métodos.....	86
5.2.1 Áreas de estudo e amostragem.....	86
5.2.2 Extração de DNA e análises genéticas.....	87
5.2.3 Análise de dados.....	88
5.3 Resultados e Discussão.....	89
5.4 Considerações Finais.....	93
Referências.....	94
6 CONCLUSÕES.....	97
ANEXO.....	99

RESUMO

Diversidade genética de *Qualea grandiflora* Mart estimada por microssatélites em quatro áreas de Cerrado do estado de São Paulo

Este estudo trata da estrutura e diversidade genética de uma espécie típica do Cerrado brasileiro, *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae), presente nas diversas fisionomias do bioma. Foram desenvolvidos oito locos microssatélites para analisar 420 amostras de indivíduos adultos pertencentes a quatro populações distribuídas no estado de São Paulo, sendo três delas em unidades administradas pelo Instituto Florestal de São Paulo (Assis, Itirapina e Pedregulho) e uma em propriedade particular (Brotas) além de 300 progênies coletadas de 25 matrizes na área de estudo em Assis. Os resultados mostraram a ocorrência média de 12,9 alelos por loco, sendo que o número médio de alelos efetivos foi seis, além de terem sido encontrados 26 alelos exclusivos nas populações. A média dos valores de Heterozigosidade esperada foi de 0,803 enquanto de Heterozigosidade observada foi de 0,512. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) variou de 0,708 a 0,801 nos locos estudados. A média dos valores de fixação foi de 0,349 indicando a presença de endogamia nas populações. Não há presença de clones em nenhuma população. O teste de adesão ao Equilíbrio de Hardy Weinberg confirma o desvio de equilíbrio em todas as populações. Há formação de estrutura populacional nas primeiras classes de distância em todas as populações estudadas, variando de 30 a 40 metros e há uma formação de 3 possíveis grupos de genótipos. A influência do efeito Wahlund foi variável nas populações (de 8,5% até 53,3%). As estimativas de tamanho efetivo populacional foram baixas (menos de 10 indivíduos) e a área mínima viável foi estimada de 4 a 184 hectares, considerando estimativas de curto, médio e longo prazos. Com relação ao sistema reprodutivo, os resultados indicam que *Q. grandiflora* Mart se reproduz por cruzamentos entre indivíduos parentes e não parentes (0,913). A taxa uniloco foi de 0,632, indicando que há mais cruzamentos entre não aparentados do que aparentados. A taxa de autofecundação foi baixa (0,087) indicando que a espécie é alógama, com pouca pré disposição para autofecundação. Aproximadamente 35% das plantas dentro de progênies eram parentes no grau de irmãos-completos e aproximadamente 57% eram meios-irmãos. Além disso, aproximadamente 8% das progênies eram irmãos de autofecundação. O coeficiente de coancestria estimado nas progênies foi de 0,139 enquanto o índice de fixação foi de aproximadamente 27%. A estimativa do tamanho efetivo indicou que a representatividade genética da descendência é inferior à esperada em progênies de cruzamentos aleatórios: as amostras analisadas correspondem a apenas 13,2 indivíduos de uma população panmítica ideal. Os resultados demonstram que a espécie possui potencial para conservação genética *in situ* embora a coleta de sementes para manter o tamanho efetivo deva utilizar de um número elevado de árvores. Sugere-se que as áreas estudadas sejam tratadas como Unidades Significativas Evolutivas (USE) e como Unidades Independentes para o Manejo (UIM).

Palavras-chave: Cerrado; Pau terra; Sistema reprodutivo; Fluxo gênico; Marcador Molecular; SSR

ABSTRACT

Genetic diversity of *Qualea grandiflora* Mart estimated by microsatellites in four Cerrado areas of São Paulo

This study deals with the structure and genetic diversity of a species typical of the Brazilian Cerrado, *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae), present in different physiognomies of this biome. We developed eight microsatellite loci to analyze 420 samples of adult individuals from four populations distributed in the state of São Paulo, three of them in units managed by the Forestry Institute of Sao Paulo (Assis, Itirapina and Pedregulho) and one in a private property (Brotas). We also analyzed 300 progeny collected from 25 matrix in Assis. The results showed an average occurrence of 12.9 alleles per locus. The average number of effective alleles was six, and 26 exclusive alleles were found in the populations. The average expected heterozygosity was 0.803 while the observed heterozygosity was 0.512. The polymorphic information content ranged from 0.708 to 0.801 at the loci studied. The mean fixation was 0.349, therefore indicating the presence of inbreeding within populations. There is no presence of clones in the populations. The test of adherence to the Hardy Weinberg Equilibrium confirms the deviation from equilibrium in all populations. There is formation of population structure in the first distance classes in all populations studied, ranging from 30 to 40 meters, and there is a formation of three possible genotype groups. The influence of the Wahlund effect varied among populations (from 8.5% to 53.3%). The effective population size estimates were low (less than 10 individuals) and the minimum viable area was estimated between 4 to 184 hectares, taking into account estimates of short, medium and long terms. Regarding the reproductive system, results indicate that *Q. grandiflora* Mart reproduces by crosses between relatives and unrelated individuals (0.913). The single locus rate was 0.632, indicating that there are more crosses between unrelated than related individuals. The self-fertilization rate was low (0.087), therefore indicating that the species is allogamous, with little predisposition for self-fertilization. Approximately 35% of the plants within progenies were full-sibs and approximately 57% were half-sibs. In addition, approximately 8% of progenies were self-fertilized brothers. The estimated coefficient of coancestry in progenies was 0.139, while the rate of fixation was about 27%. The estimated effective size indicated that the genetic representativeness of the offspring is lower than the expected in random cross progenies: the samples analyzed account for only 13.2 individuals in a ideal panmitic population. The results show that this species has potential for *in situ* genetic conservation, although the collection of seeds to maintain the effective size should use a large number of trees. It is suggested that the studied areas be treated as evolutionary significant units and as independent units for management.

Keywords: Cerrado; pau terra; Reproductive system; Gene flow; Molecular markers; SSR

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro comporta uma diversidade de paisagens, constituídas por diferentes fisionomias de vegetação, vinculadas a fatores físicos e fisiográficos. Sua flora vascular tem um percentual de endemismo estimado em 44% (SILVA; BATES, 2002; FELFILI et al., 2005). Por esta característica, bem como a perda da maioria de sua extensão original, enquadra-se como um *hotspot*, ou seja, uma das áreas de alta biodiversidade mais ameaçada do planeta e tida como prioritária para conservação (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2005) que abrigam mais de 60% da vida do planeta, embora ocupem apenas cerca de 2,3% da superfície da Terra (CONSERVATION INTERNATIONAL, 2005).

Uma estimativa sobre a vegetação natural remanescente indica que o Cerrado sofreu um grande impacto. Cerca de 78,7% de sua área está sob alguma forma de uso pelo homem, o que significa que apenas 432.814 km² ainda se conservam intactos no planeta (CONSERVATION INTERNATIONAL, 2005). Estes impactos trazem grandes danos ambientais, dentre eles a fragmentação de habitats, que é responsável pela diminuição da biodiversidade e extinção de espécies.

Em 2002 o Ministério do Meio Ambiente apresentou extenso relatório contendo informações acerca da biodiversidade dos biomas brasileiros (BRASIL, 2002), propondo 87 áreas prioritárias para conservação, incluindo o Cerrado. A delimitação das áreas foi realizada com base nas distribuições de elementos da biota, enfatizando áreas de alta riqueza de espécies, com alto grau de endemismo biológico. Como resultado deste trabalho foram propostas estratégias de monitoramento, selecionando-se espécies endêmicas representativas, espécies raras ou ameaçadas e espécies de interesse econômico, estimulando-se todos os estudos relacionados à conservação.

Os avanços da biologia molecular tem permitido dar novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e estudos de biologia populacional, de maneira que os objetivos propostos pelo Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2002) possam também ser atingidos com o uso de ferramentas genéticas. Ou seja: a variação encontrada nos organismos pode ser analisada em nível de DNA.

O estudo da diversidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis de variação genética mantida dentro das mesmas, bem como a forma em que a variação genética é dividida entre elas (HAMRICK, 1996). Este enfoque permite fornecer informações sobre a interação de características da paisagem com processos de microevolução, tais como o fluxo genético e seleção de espécies. Permite também identificar limites críticos, que são

rupturas dos genes que fluem através de populações sem causas óbvias e sem contatos entre populações previamente isoladas (MANEL et al., 2003).

Em contraste aos estudos tradicionais de genética de populações, este âmbito de pesquisa permite desvendar descontinuidades nos genes de populações (GUILLOT et al., 2005), desvendar a estrutura genética de populações (MANEL et al., 2003; HOLDEREGGER; WAGNER, 2006) e identificar barreiras antropogênicas específicas que reduzem o fluxo genético e a diversidade genética, consequentemente permitindo estabelecer corredores biológicos potenciais para conservação (STORFER et al., 2007).

Trabalhos relacionados à estrutura e diversidade genética de populações com espécies arbóreas já foram desenvolvidos com sucesso por vários pesquisadores, como Zucchi et al. (2005), Gusson, Sebbenn e Kageyama (2006), Estopa et al. (2006), Martins et al. (2006, 2008), Tarazi (2009), dentre outros. Estes trabalhos visam adquirir informações genéticas relevantes que possam ser empregadas em programas de conservação genética e melhoramento florestal.

1.1 Objetivos

Este trabalho teve por objetivo geral estudar a diversidade genética de *Qualea grandiflora* Mart em populações naturais em áreas de Cerrado no estado de São Paulo. E de maneira específica:

- Desenvolver marcadores microssatélites para a espécie *Qualea grandiflora* Mart;
- Caracterizar a variabilidade genética inter e intrapopulacional em populações naturais de *Qualea grandiflora* Mart;
- Caracterizar o sistema reprodutivo de *Qualea grandiflora* Mart;
- Fornecer subsídios para estudos de Genética da Paisagem visando à conservação genética e ecológica do Cerrado.

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 O cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro. Possui aproximadamente 2 milhões de km² e ocupa cerca de 24% do território nacional (MMA, 2006). Sua maior área localiza-se uniformemente no Planalto Central do Brasil (Figura 1.1), mas estende-se também em áreas denominadas periféricas, que abrangem os estados do Maranhão, Piauí, Tocantins, São Paulo e Paraná (RIBEIRO; WALTER, 1998).

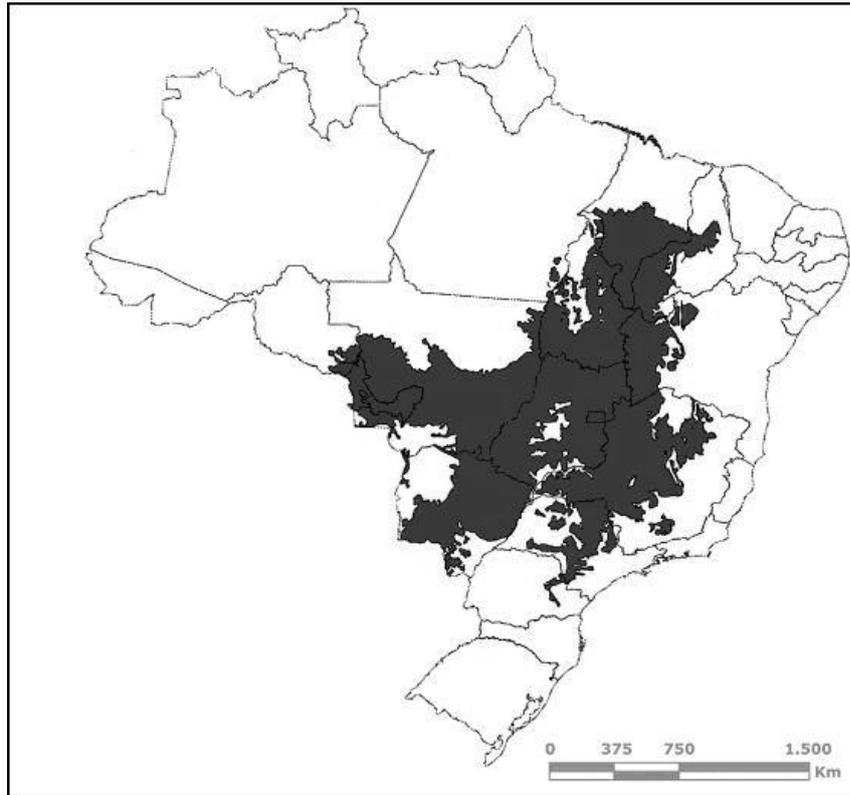


Figura 1.1- Distribuição do Cerrado no Brasil. Fonte: WWF Brasil (2006)

O clima do Cerrado é predominantemente tropical estacional com um regime de chuvas no verão. A precipitação anual varia entre 750 a 2000 mm, com média anual de 1500 mm. Durante a estação das secas, os índices pluviométricos mensais reduzem-se bastante, podendo chegar à zero. As temperaturas médias são em torno de 23°C na região sul e 27°C na porção norte (KLEIN, 2002).

Os solos do Cerrado são profundos, apresentam permeabilidade, porosidade e baixa capacidade para retenção de água. A maior ocorrência são os Latossolos, cobrindo 46% da extensão do bioma. Esses tipos de solos podem apresentar uma coloração variando do vermelho para o amarelo, são profundos, bem drenados na maior parte do ano, apresentam acidez, toxidez de alumínio e são pobres em nutrientes essenciais (como cálcio, magnésio, potássio e alguns micronutrientes) para a maioria das plantas. Há ocorrência também de solos pedregosos e rasos (Neossolos Litólicos), arenosos (Neossolos Quartzarênicos), orgânicos (Organossolos) e outros de menor expressão (REATTO; MARTINS, 2005; SANZONOWICZ, 2007).

O Cerrado comporta uma diversidade de paisagens, constituídas por diferentes fisionomias de vegetação e padrões de composição florística, vinculados a fatores físicos e fisiográficos. Henriques (2005) propõe agrupar o Cerrado em quatro fisionomias principais:

Campo limpo, Campo sujo, Cerradão e Cerrado *sensu stricto* (Figura 1.2). No entanto, a classificação mais utilizada atualmente é a de Ribeiro e Walter (1998), que descrevem onze tipos fisionômicos gerais para o Cerrado, enquadrados como formações florestais, savânicas e campestres, considerando a estrutura, formas de crescimento e possíveis mudanças estacionais.

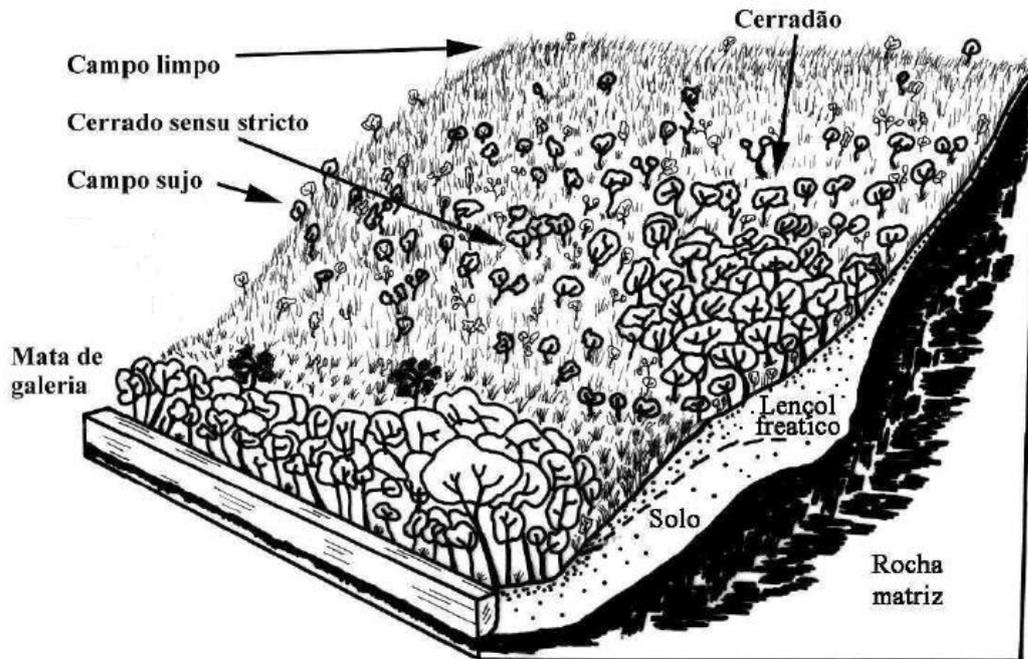


Figura 1.2 – Perfil esquemático das fisionomias de Cerrado com relação à profundidade do solo na vertente de um vale (HENRIQUES, 2005 - p.78)

A biota do Cerrado, de acordo com Silva e Bates (2002), possui um elevado número de espécies endêmicas, mas também conta com espécies comuns ao campo limpo e às florestas úmidas. Esta interação entre o Cerrado e formações adjacentes tem ganhado mais atenção na última década, pois este se limita com todos os demais biomas de terras baixas da América do Sul (SILVA; SANTOS, 2005).

Coutinho (2000) estimou a flora do Cerrado em 3.000 espécies, sendo aproximadamente 2.000 do estrato subarbustivo e o restante do estrato arbóreo-arbustivo. Walter (2006) cita adicionalmente a contribuição de pesquisadores como Goodland (1971) e Heringer et al. (1977), que ampliaram consideravelmente a lista de espécies de Cerrado, contrariando a visão disseminada que se tinha a respeito da pobreza desse bioma em espécies vegetais.

A lista mais atualizada para a flora vascular do Cerrado consta de 11.627 espécies (MENDONÇA et al., 2008), a qual já alcançou um número de espécies muito superior às mais otimistas projeções anteriores (WALTER, 2006), sendo, no entanto, necessário dar

continuidade aos estudos florísticos para seu incremento. Para Mendonça et al. (2008) o Cerrado tem se mostrado muito mais rico do que se previa e muitas das suas tipologias são endêmicas da América do Sul e do Brasil. Devido a estas e outras características, o Cerrado é enquadrado atualmente como um dos 34 *hotspots* mundiais, ou seja, as zonas com maior concentração de biodiversidade do planeta e que merecem atenção especial por estarem em constante ameaça de extinção (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2005).

O desmatamento do Cerrado foi estimado em 3 milhões de hectares/ano (MACHADO et al., 2004). Segundo Sano et al. (2008), em quatro décadas cerca de 26% do território compreendido pelo Cerrado foi transformado em áreas de pastagem e 10% em agricultura. Apenas 7,44% de sua área é protegida por unidades de conservação, federais, estaduais e municipais (MMA, 2006), sendo que cerca de 20% das espécies endêmicas e ameaçadas localizam-se fora dessas unidades de conservação (MACHADO et al., 2004).

No estado de São Paulo, o Cerrado apresenta-se sob a forma fragmentos isolados em meio a canaviais, pastagens e outras formações florestais, totalizando uma área de 21.000 hectares (DURIGAN et al., 2007).

1.2.2 Estrutura e diversidade genética

A estrutura genética é a distribuição não aleatória dos alelos e genótipos dentro das espécies (HAMRICK, 1983). Sua manutenção ocorre devido à interação entre fatores evolutivos, como seleção, deriva, migração e mutação, com fatores ecológicos como o sistema reprodutivo, distribuição espacial, tamanho efetivo, dispersão de pólen e sementes. A caracterização da estrutura genética entre populações tem sido realizada por três metodologias: estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1965); análise da variância de frequências gênicas (COCKERHAM, 1969) e análise da diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973). As três abordagens apresentam bases genéticas similares, procurando verificar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações.

Modelos clássicos de genética de populações que descrevem a estruturação genética de populações de plantas assumem que a atual estrutura genética reflete um equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico (WRIGHT, 1951). Contudo, a troca genética é restrita em muitos grupos, tanto pela larga distribuição geográfica da espécie, quanto por limitada dispersão de pólen e/ou sementes (EHRlich; RAVEN, 1969). Nesses casos, eventos históricos, como expansão, fragmentação e efeito gargalo, serão fortes fatores determinantes da estrutura genética atual dessas populações (AVISE, 2000).

O termo diversidade genética foi originalmente definido por Nei (1973) e se refere à quantidade potencial de heterozigotos em uma dada população considerando as frequências genotípicas em equilíbrio de panmixia (os indivíduos da população se reproduzem a partir de cruzamentos ao acaso, sem nenhuma restrição e a população é grande o suficiente para permitir que todos os genótipos possam se manifestar na frequência do equilíbrio). De acordo com Hamrick (1983), o estudo da diversidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis de variação genética dentro das populações, bem como a forma que ela é dividida entre as mesmas.

Mais recentemente, o termo diversidade genética tem sido empregado para caracterizar medidas objetivas (índices) que possam quantificar a variação genética em populações (variações herdáveis encontradas que possam ser mensuradas em indivíduos, populações e espécies). Os índices mais utilizados são: porcentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco, heterozigosidade esperada ou diversidade gênica em equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada e índice de fixação (BERG; HAMRICK, 1997).

Segundo Loveless e Hamrick (1987), em espécies tipicamente alógamas ocorre maior variação genética dentro das populações e menor entre elas, sendo que a divergência entre populações será menor quanto maior for o fluxo gênico. Já em populações que se reproduzem por autofecundação, onde se tem limitada dispersão de sementes, ocorre baixa variação dentro das populações e alta entre elas. Em estudos com espécies arbóreas, Hamrick (1983) verificou que a distribuição dos alelos e genótipos não é aleatória dentro das populações, sendo determinada pela dispersão de pólen e sementes, ambiente de distribuição e seleção micro ambiental.

A diversidade genética promove matéria prima para a adaptação das espécies, sendo também a base para o melhoramento genético. Ela é a responsável por parte das diferenças de produtividade e reprodução entre os indivíduos de uma espécie (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005). Sua determinação em espécies arbóreas é de suma importância já que estas espécies são fundamentais na estrutura dos ecossistemas florestais. Espécies que apresentam valores baixos de diversidade genética podem ter reduzida sua capacidade de sobreviver a doenças e não se adaptarem a mudanças ambientais. Assim a diversidade genética pode ser considerada de fundamental importância para a sustentabilidade e estabilidade dos ecossistemas (RAJORA; PLUHAR, 2003).

1.2.3 Fluxo gênico em populações naturais

A dispersão do pólen e de sementes entre as populações é conhecida como fluxo gênico. Este mecanismo, que inclui todos os fatores que levam à movimentação de alelos entre as populações, reduz a diferenciação genética entre as mesmas, podendo promover o aumento da variabilidade genética (WRIGHT, 1951; SLATKIN, 1987). Sua relação com a diversidade genética intra e interpopulacional, depende tanto da distribuição geográfica da espécie quanto da importância dos fatores evolutivos (SLATKIN, 1987).

Quando um indivíduo migra de uma população para outra, ele carrega genes que são representativos de sua população ancestral para a população receptora. Caso ele tenha sucesso em seu estabelecimento e realize cruzamentos, ele irá transmitir esses genes entre as populações, sendo que essa transferência é chamada de fluxo gênico. Quando o pólen atinge a população ele já é incorporado por ela, enquanto que a semente tem que se transformar em plântula e se desenvolver para ser incorporada. O fluxo gênico é o fator evolutivo responsável pela homogeneização das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção (RIDLEY, 2006).

As diferenças nos padrões de dispersão de sementes têm efeitos nos níveis de distribuição da variação genética nas populações. Por exemplo, espécies que apresentam polinização por animais que percorrem grandes distâncias, terão maior diversidade genética do que aquelas polinizadas pelo vento ou animais que percorrem curtas distâncias. No entanto, a dispersão pelo vento gera maior diversidade genética dentro das populações (HAMRICK; LOVELESS, 1986, 1989).

Os padrões de fluxo gênico em populações naturais podem ser estudados por diversos métodos, dentre eles os indiretos, que são baseados na estrutura genética de populações, utilizando-se de índices como o fluxo gênico aparente (F_{st}), alelos privativos e autocorrelação espacial. O índice F_{st} pode ser utilizado para estimar o número de migrantes por geração (N_m) para um conjunto de populações ou de subpopulações (ZUCCHI, 2002). Já o uso de alelos privativos para avaliação do fluxo gênico, foi descrito por Slatkin (1985), e é baseado na frequência média de alelos que são exclusivos de uma ou poucas populações (que podem ser alelos raros). A frequência destes alelos é utilizada para estimar a média do número de migrantes permutados entre as populações.

1.2.4 Espécie de estudo

Qualea grandiflora Mart (Vochysiaceae) é uma espécie arbórea de ocorrência em cerrado *strictu sensu*, campos cerrados e cerradão (RATTER et al. 2003). Pode atingir 20 m

de altura, possui tronco tortuoso e casca grossa com fissuras transversais e longitudinais. É considerada símbolo dos Cerrados (ALMEIDA et al., 1998), sendo conhecida popularmente como pau terra, pau terra do campo, pau terra do Cerrado, entre outros (CORREA, 1978).

É uma espécie acumuladora de alumínio estando muito presente em solos distróficos, apresentando em função do solo uma distribuição muito variável dentro das fitofisionomias de Cerrado (ALMEIDA et al., 1998).

As folhas de *Q. grandiflora* Mart (Figura 1.3) são opostas, rígidas, de ápice afilado (acuminadas), com nervuras proeminentes na face superior e sulcadas na face inferior (PAULA; ALVES, 1997). As inflorescências são cachos compostos (tirso de cincinos), em geral no ápice dos ramos, com muitas flores amarelas. As flores (Figura 1.4) têm uma só pétala de cor amarela e um prolongamento no cálice (espora ou calcar) onde se acumula néctar. Os frutos são alongados e lenhosos de cor castanha (cápsula loculicida) abrindo-se em três partes (valvas) para liberar sementes aladas (PAULA; ALVES, 1997; ALMEIDA et al., 1998).

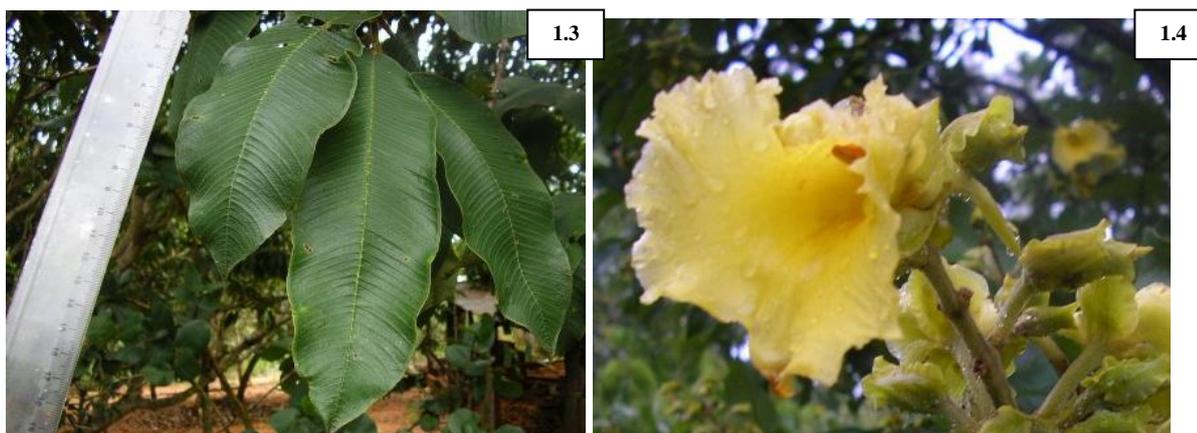


Figura 1.3 - Aspecto das folhas de *Q. grandiflora* Mart. Imagem: Valdir Dala Marta, 2008

Figura 1.4 - Flor de *Q. grandiflora* Mart. Imagem: Valdir Dala Marta, 2008

É uma espécie que perde as folhas (decídua) durante a estação seca (DUTRA, 1987), de abril a agosto. A floração inicia junto com o brotamento de folhas novas, de setembro a outubro, no início da estação chuvosa e se estende no decorrer desta até dezembro e janeiro (BARBOSA, 1983; DUTRA, 1987). A polinização é realizada por mariposas (SILBERBAUER-GOTTSBERGER; GOTTSBERGER, 1975) do tipo Sphingidae (BORGES, 2000). Os frutos (Figura 1.5) levam cerca de um ano para amadurecer, em agosto e setembro do ano seguinte, com as plantas sem folhas (ALMEIDA et al., 1998). As sementes são dispersas por anemocoria (WEISER; GODOY, 2001).



Figura 1.5 - Fruto de *Q. grandiflora* Mart imaturo (a) e em deiscência (b) Imagens: Valdir Dala Marta, 2008

O peso médio de 100 sementes é 12 g, sendo que estas possuem umidade inicial de 16% e apresentam 75% de viabilidade após dessecação (WETZEL, 1997). Não é necessário tratamento pré-germinativo, mas as sementes perdem a viabilidade em poucos meses (DAVIDE et al., 1995). A germinação observada em laboratório foi de 56% (WETZEL, 1997). Costa e Franco (2007) testaram o estabelecimento da espécie em campo sujo obtendo germinação de 68% das sementes, enquanto no cerradão apenas 38,58% conseguiram germinar. Segundo Davide et al. (1995), os frutos devem secar ao sol até a deiscência para que em seguida as sementes possam ser removidas.

Com relação ao seu aproveitamento econômico, a madeira de *Q. grandiflora* Mart pode ser utilizada para mourões, carvão e lenha (PAULA; ALVES, 1997), sendo também empregada em tábuas, forros, móveis, brinquedos, caixotaria e pasta para papel. Suas características morfológicas são adequadas para uso paisagístico embora apresente crescimento muito lento. O cozimento de frutos permite extrair corantes verde e amarelo, utilizados no tingimento de fios de algodão para tecelagem (ALMEIDA et al., 1998).

Na medicina tradicional, a infusão dos frutos de *Qualea grandiflora* Mart é usada no tratamento de asma (CORRÊA, 1978) e a infusão das cascas para limpeza externa de úlceras e feridas e também contra inflamações (ALMEIDA et al., 1998). O chá feito com as folhas é utilizado para cólicas intestinais, diarreias com sangue e amebíase (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Estudos realizados por Souza et al. (2007) relatam a atividade antioxidante de *Qualea grandiflora* Mart. Ayres et al. (2008a, 2008b) identificam os flavonóides como responsáveis pela resposta antioxidante e relatam que o extrato etanólico das folhas de *Q. grandiflora* Mart

apresenta atividade inibitória classificada como moderada ou ativa sobre o crescimento microbiano. Estes resultados pareceram bastante promissores, especialmente para as bactérias Grampositivas, uma vez que este extrato apresentou um efeito inibidor tanto sobre as cepas das espécies mais sensíveis como sobre as mais resistentes.

1.2.5 Áreas de estudo

As áreas de estudo possuem distâncias bastante variáveis entre si (Tabela 1.1), sendo três delas em unidades administradas pelo Instituto Florestal do estado de São Paulo (Horto Florestal de Assis, Estação Experimental de Itirapina e Parque Estadual Furnas do Bom Jesus em Pedregulho) e uma em propriedade particular (Fazenda Marimbondo, em Brotas), conforme Figura 1.6.

Tabela 1.1 - Distância em quilômetros entre as quatro áreas de estudo no estado de São Paulo

	Brotas	Itirapina	Pedregulho
Assis	275	350	460
Brotas	-	24	280
Itirapina	-	-	280

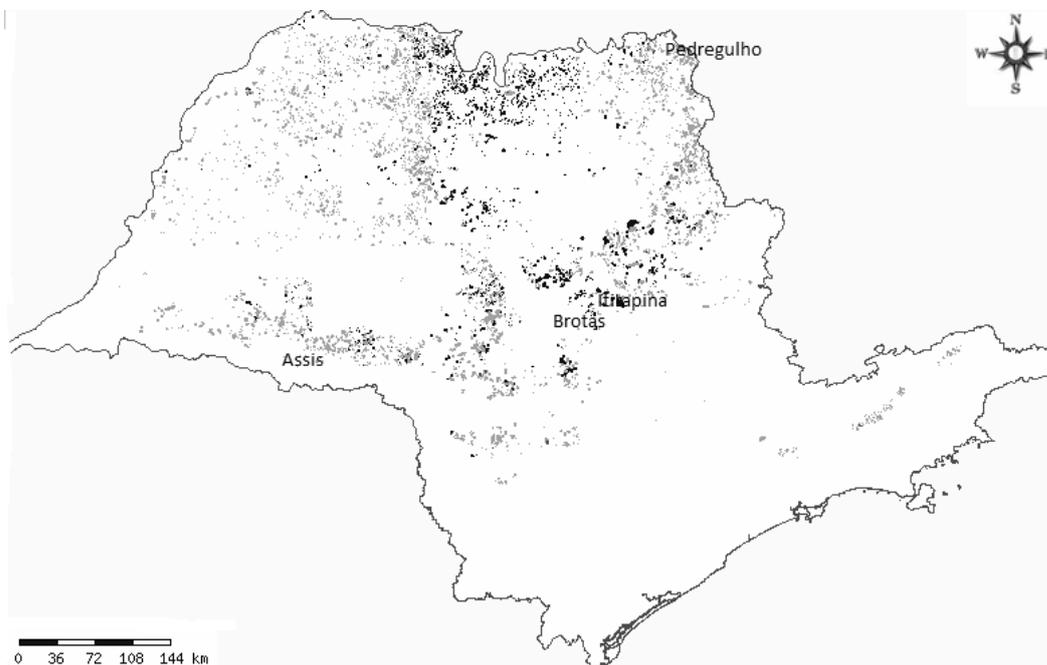


Figura 1.6 - Localização das áreas de estudo no estado de São Paulo. Fonte: Atlas BIOTA FAPESP/Centro de Referência em Informação Ambiental (2012). As áreas em cinza referem-se à remanescentes de Cerrado mapeados no estado.

A Floresta Nacional de Assis (Decreto Estadual 47.098/02) possui uma área total de mais de 3.000 hectares (Figura 1.7), estando localizada nas coordenadas 22°36'00''S e

50°24'28''O. A área de estudo fica próxima à represa do Horto Florestal, a 540 metros de altitude e possui aproximadamente 2,2 hectares. Sua fisionomia é de Cerrado *sensu stricto* (RIBEIRO; WALTER, 1998), com presença de braquiária e cobertura arbórea média de 46,3% (PINHEIRO; DURIGAN, 2009).



Figura 1.7 - Floresta Nacional de Assis, com a delimitação da área de estudo (em vermelho), próxima à represa do Horto Florestal

A Fazenda Marimbondo em Brotas (22°22'18''S e 48°01'24''O), possui aproximadamente 400 hectares de Cerrado (Figura 1.8), constituído por fisionomias de cerradão e Cerrado *strictu sensu*. Seu entorno inclui áreas de canaviais e de pastagens. A área de estudo dentro da propriedade é de aproximadamente 0,9 hectares e está a 650 metros de altitude.



Figura 1.8 - Fazenda Marimbondo em Brotas, SP. Em vermelho a delimitação da área de estudo

A Estação Experimental de Itirapina (Decreto Estadual 22.335/84) possui uma área aproximada de 3.212 hectares (Figura 1.9) e está localizada nas coordenadas 22° 13'03''S e 47° 50'15''O. Seu entorno inclui canaviais, pastos, reflorestamento de *Pinus sp* e *Eucalyptus*

sp além de fazer divisa com a Estação Ecológica de Itirapina, também administrada pelo Instituto Florestal. A área de estudo é conhecida como “Cerrado Valério” e tem aproximadamente 1,4 hectares, localizados a aproximadamente 750 metros de altitude. A fisionomia é do tipo cerradão, segundo Ribeiro e Walter (1998), caracterizando-se por apresentar flora com elementos do Cerrado *sensu stricto* e de mata, com cobertura arbórea de 50-60%. O estrato arbóreo é composto por indivíduos tortuosos e eretos, com alturas médias de 8 a 15 metros.



Figura 1.9 - Estação Experimental de Itirapina, SP. Em vermelho a área de estudo (Cerrado Valério)

O Parque Estadual Furnas do Bom Jesus (Decreto Estadual 30.591/89), localiza-se em Pedregulho, nas coordenadas 20°13'40''S e 47°26'18''O. Possui mais de 2.000 hectares de extensão (Figura 1.10), com áreas de Cerrado de diferentes fisionomias. A área de estudo fica próxima ao alojamento do parque e do centro de visitantes. Possui aproximadamente 0,9 hectares e está a 1000 metros de altitude. A fisionomia é do tipo Cerrado *sensu stricto* do tipo ralo (RIBEIRO; WALTER, 1998), com solo areno-pedregoso. Possui cobertura arbórea de 5 a 20% e altura média de 2 a 3 metros.

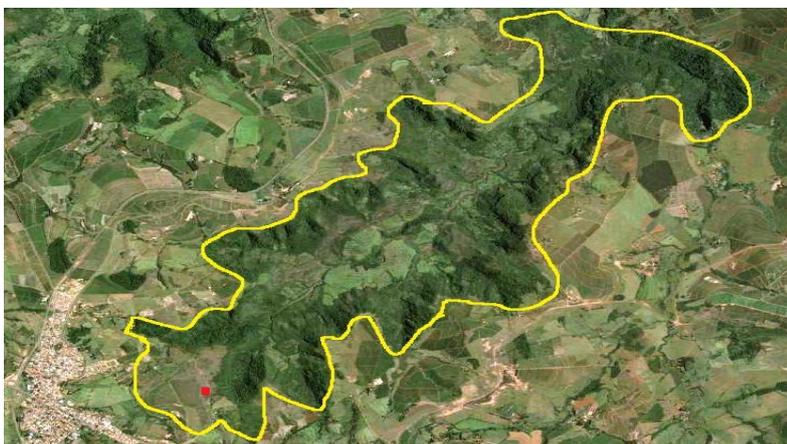


Figura 1.10 - Parque Estadual Furnas do Bom Jesus em Pedregulho SP. Em vermelho a área de estudo

Referências

- ALMEIDA, S.P, PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M., RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planatina: Embrapa Cerrados, 1998. 464 p.
- AVISE, J.C. 2000. **Phylogeography** - the history and formation of species. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 447pp.
- AYRES, M.C.C.; ESCÓRCIO, S.P.; DA COSTA, D.A.; CHAVES, M.H.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; CAVALHEIRO, A.J. Constituintes químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: Atribuição dos dados de RMN de dois flavonóides glicosilados acilados diastereoisoméricos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n.6, p. 1481-1484, 2008 (a)
- AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.18, n.1, p. 90-97, 2008 (b)
- BARBOSA, A.A.A. **Aspectos da ecologia reprodutiva de três espécies de Qualea (Vochysiaceae) em Cerrado de Brasília**. 92 p. 1983. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade de Brasília, Brasília, 1983.
- BERG, E. E.; HAMRICK, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, 1997.
- BORGES, H.B.N. **Biologia reprodutiva e conservação do estrato lenhoso numa comunidade do cerrado**. 158 p. 2000. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília. 2002. 404 p.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado - Programa Cerrado Sustentável**. Brasília, 2006. 56p.
- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lancaster, v.23, n.1, p.72-74, 1969.
- CONSERVATION INTERNATIONAL. **Hotspots Revisitados - As Regiões Biologicamente Mais Ricas e Ameaçadas do Planeta**. 2005. Disponível em <<http://www.conservation.org.br/publicacoes/files/HotspotsRevisitados.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2012.
- CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1978. v.5, 687 p.

COSTA, J.V.M.; FRANCO, A.C. Estabelecimento de *Qualea grandiflora* Mart e *Kielmeyera coriacea* Mart e seu comportamento sazonal em duas fitofisionomias típicas dos cerrados do Brasil Central. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL. São Lourenço. **Anais eletrônicos...** São Lourenço, SBE, 2007. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiiceb/pdf/777.pdf>> Acesso em: 26 abr. 2012.

COUTINHO, L. **Aspectos do Cerrado**. 2000. Disponível em: <<http://eco.ib.usp.br/cerrado>>. Acesso em: 01 mar. 2012.

DAVIDE, A.C.; FARIA, J. M.R.; BOTELHO, S.A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG, 1995. 41p.

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

DUTRA, R.C. Fenologia de dez espécies arbóreas nativas do Cerrado de Brasília - DF. **Brasil Florestal**, Brasília, v.62, p. 23-41, 1987.

EHRlich, P.R.; RAVEN, P.H. Differentiation of populations. **Science**, Washington v.165, p.1228-1232, 1969.

ESTOPA, R.A.; SOUZA, A.M.; MOURA, M.C.O.; BOTREL, M.C.G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* DC. MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.70, p. 97-106, 2006.

FELFILI, J.M.; SOUSA SILVA, J.C.; SCARIOT, A. Biodiversidade, Ecologia e Conservação do Cerrado: avanços no conhecimento. In: SCARIOT, A.; SOUSA SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org.) **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p.25-44

GOODLAND, R. A physiognomic analysis of the Cerrado vegetation of central Brazil. **Journal of Ecology**, London, v. 59, p. 411-419, 1971.

GUILLOT, G.I., MORTIER, F.; ESTOUP, A. Geneland: a computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, n.3, p. 712-715, 2005.

GUSSON, E.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers. **Revista Árvore**, Londrina, v.30, n.4, p. 491-502, 2006 .

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, S.H. et al. (Eds.). **Genetics and wild population management**. New York: Addison-Wesley, 1983. cap. 4, p. 500-508.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T.H. (Eds.). **Frugivores and seed dispersal**. Dordrecht: Junk Publishers, 1986. cap. 17, p. 211-223.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: Associations with reproductive biology. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y.B. (Eds.) **Plant evolutionary ecology**. Boulder: Westview Press, 1989. cap. 2, p. 131-146.

HAMRICK, J.L. (Ed.) **Conservation genetics: case studies from nature**. New York: Chapman e Hall, 1996. p.471-501.

HENRIQUES, R.P.B. Influência da história, solo e fogo na distribuição e dinâmica das fitofisionomias no bioma do Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org.) **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p.73-92.

HERINGER, E.P.; BARROSO, G.M; RIZZO, J.A.; RIZZINI, C.T. A flora do Cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 5, 1977. São Paulo. **Bases para a utilização agropecuária**. São Paulo: Itatiaia, 1977. p.211-232.

HOLDEREGGER, R.; WAGNER, H.H. A brief guide to landscape genetics. **Landscape Ecology**, London, v. 21, p. 793–796, 2006.

KLEIN, A.L. (Org.). **Eugen Warming e o Cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: UNESP, 2002. 156 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J.L. Distribution de la variation genetica en especies arboreas tropicales. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 35, n. 1, p.165-176, 1987.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 326p

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

MANEL, S., SCHWARTZ, MK., LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 18, p. 189–197, 2003

MARTINS, K. ; CHAVES, L. J. ; BUSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. . Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, Oxford, v, 7, p. 957-969, 2006.

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

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA-JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. B.; FILGUERIAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E; FAGG, C. W. Flora Vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.;

RIBEIRO, J. F. (Org.) **Cerrado: ecologia e flora.** Brasília: Embrapa Cerrados. , 2008. cap 15, p. 213-228

MITTERMEIER, R.A., GIL, R.P., HOFFMAN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C.G., LAMOREUX, J.; FONSECA, G.A.B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions.** Boston: University of Chicago Press, 2005. 391 p.

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

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, Washington, v.70, n.12, p. 3321-3323, 1973

PAULA, J. E. de; ALVES, J. L. de H. **Madeiras Nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso.** Brasília: Empresa Gráfica Gutenberg, 1997. 540p.

PINHEIRO, E.S.; DURIGAN, G. Dinâmica espaço-temporal (1962-2006) das fitofisionomias em unidade de conservação do Cerrado no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, p. 441-454, 2009.

RAJORA, O.P.; PLUHAR, S.A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 106, n.7, p. 1203-1212, 2003

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 60, n.1, p. 57-109, 2003.

REATTO, A.; MARTINS, D.E. Classes de solo em relação aos controles da paisagem do bioma Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUZA SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 439 p.

RIBEIRO, J.F.; WALTER B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S.; ALMEIDA, S.P. (Eds). **Cerrado: ambiente e flora.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998. p. 87-166.

RIDLEY, M. **Evolução.** 3. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2006. 752p

RODRIGUES, V. E. G; CARVALHO, D. A. de. **Plantas Medicinais no Domínio dos Cerrados.** Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

SANO, E.E.; ROSA, R.; BRITO J.L.; FERREIRA, L.G. Mapeamento semidetalhado (escala de 1:250.000) da cobertura vegetal antrópica do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 153-156, 2008.

SANZONOWICS, C. **Solos do cerrado.** Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_14_911200585231.html> Acesso em: 20 abr. 2012

SCARIOT, A.; SOUSA SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 430 p.

SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. Uber sphingophile Angiospermen Brasiliens. **Plants Systematics and Evolution**, Wien, n.123, p.157-184, 1975.

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

SILVA, J.M.C.; SANTOS, M.P.D. A importância relativa dos processos biogeográficos na formação da avifauna do Cerrado e de outros biomas brasileiros. In: SCARIOT, A.; SOUZA SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Orgs). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. cap. 12, p.219-234.

SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, Malden, v. 39, n. 1, p. 53-65, 1985.

SLATKIN M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **American Association for the Advancement of Science**, Washington, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; AYRES, M.C.C.; DA COSTA, C.L.S.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B de M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, p. 351-355, 2007

STORFER, A., MURPHY, M.A., GOLDBERG, C.S., ROBINSON, S., SPEAR, S.F., DEZZANI, R., DELMELLE, E., VIERLING, L.; WAITS, L.P. Putting the 'landscape' in landscape genetics. **Heredity**, Washington, v.98, p. 128-142. 2007

TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no Cerrado**. 139 p. 2009. Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

WALTER, B.M.T. **Fitofisionomias do Bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas**. 389 p. 2006. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

WEISER, V.L.; GODOY, S.A.P. Florística em um hectare de Cerrado sensu stricto na ARIE - Cerrado Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 201-212, 2001

WETZEL, M.M.V.S. **Época de dispersão e fisiologia de sementes do Cerrado**. 167 p. 1997. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

WWF Brasil - World Wildlife Fund Brasil. **Mapa do Bioma Cerrado**. Disponível em: <http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_cerrado/mapa_bioma_cerrado/> Acesso em: 10 mar 2012

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

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistic with spatial regard to systems of mating. **Evolution**, Malden, v.19, n. 3, p. 395-420, 1965.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

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

2 O USO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO DO CERRADO¹

Resumo

Os avanços da biologia molecular nas últimas décadas, aliados à crescente preocupação do meio científico em avaliar as consequências genéticas que a fragmentação de habitats exerce sobre as espécies, criaram novas perspectivas para os estudos de genética populacional, permitindo que a biodiversidade seja estudada por meio da diversidade molecular. As iniciativas relativas à genômica da conservação tem sido de grande valia para delinear estratégias de conservação genética eficientes a médio e longo prazos. Discute-se aqui o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites em estudos de diversidade genética voltados para espécies do Cerrado. São marcadores altamente informativos e ocorrem abundantemente no genoma de plantas. Embora os custos envolvidos no desenvolvimento de microssatélites sejam elevados, seu uso vem crescendo exponencialmente nos estudos de ecologia reprodutiva, conservação e manejo de populações. Os resultados obtidos com este tipo de ferramenta permitem identificar o sistema reprodutivo de espécies, além de possíveis hibridizações, estimar riscos genéticos de extinção, detectar populações vulneráveis, determinar a área mínima viável de unidades de conservação, dentre outros.

Palavras- chave: Cerrado; Microssatélites; SSR; Diversidade genética

Abstract

Advances in molecular biology in recent decades and the growing interest of the scientific community in assessing the genetic consequences of habitat fragmentation on species have allowed the creation of new perspectives for research on population genetics, where biodiversity is investigated by means of molecular diversity. The initiatives for conservation genomics have been invaluable to delineate effective strategies for genetic conservation in the short and long term. In this paper we discuss the use of microsatellite molecular markers in studies of genetic diversity focused on species of Cerrado. Markers are highly informative and occur profusely in the genome of plants. Despite the high costs involved in developing microsatellites, their use has grown exponentially in reproductive ecology, conservation and population management. This tool allows the identification of the reproductive system of species and possible hybridizations, as well as the estimation of genetic risks of extinction, detection of vulnerable populations and determination of the minimum viable area of conservation, among others.

Keywords: Cerrado; Microsatellite; SSR; Genetic diversity

2.1 Introdução

A preocupação em avaliar as consequências genéticas que a fragmentação de habitats exerce sobre as espécies tem levado o meio científico a questionar a fragilidade genética de populações e as estratégias envolvidas na conservação de espécies ameaçadas de extinção.

¹RITTER, L.M.O.; KAGEYAMA, P.Y. Application of microsatellite molecular markers in studies of genetic diversity and conservation of cerrado. Artigo submetido à publicação na revista **Scientia Forestalis**.

Para tanto, há necessidade de se obter informações cada vez mais detalhadas sobre a estrutura e diversidade genética de populações naturais.

A genômica vem ganhando importância como ferramenta nos programas de conservação da biota, pois permite que a biodiversidade seja estudada por meio da diversidade molecular existente nas populações naturais de diversas espécies sob impacto antropogênico direto ou indireto (SOLE-CAVA, 2001).

Fortemente criticadas pelos conservacionistas durante o fim da década de 80 (por restringirem-se às estimativas de heterozigosidade em populações submetidas a gargalos populacionais), as iniciativas relativas à genômica da conservação vem sendo potencializadas ao nível de critério primordial na condução de programas internacionais de conservação (TORRES, 2003).

Estes estudos permitem descrever a variação genética de populações e seus mecanismos de manutenção desta variabilidade (NEI, 1987), disponibilizando um instrumento vigoroso para a detecção das relações e dos limites entre espécies e linhagens (AVISE, 1994), reconhecimento da dinâmica reprodutiva, estrutura genética da população (MANEL et al., 2003; HOLDEREGGER; VAGNER, 2006), dinâmica de migração e dispersão de espécies e populações (AVISE, 1994), além de desvendar descontinuidades nos genes de populações (GUILLOT et al., 2005).

Como consequência deste âmbito de pesquisa, surgiu a Genética da Paisagem (MANEL et al., 2003), que emergiu integrando a ecologia da paisagem, estatística espacial e genética de populações. Análises genéticas da paisagem permitem identificar barreiras antropogênicas específicas que reduzem o fluxo genético e a diversidade genética, consequentemente permitindo estabelecer corredores biológicos potenciais para conservação (STORFER et al., 2007).

Estas análises vem sendo aliadas à Genética da Conservação, cujo objetivo é gerar subsídios para a compreensão de processos populacionais e evolutivos relevantes para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (OURBORG; VERGEER; MIX, 2006). O conhecimento das variações genéticas das espécies e populações tem sido de grande valia para delinear estratégias de conservação genética eficientes a médio e longo prazos.

2.2 Marcadores Moleculares Microsatélites

A diversidade genética é introduzida continuamente nas populações por mutação, recombinação e fluxo gênico e pode ser perdida por deriva genética, endocruzamentos e pela maior parte dos tipos de seleção natural (NEI, 1987). A principal ferramenta para avaliar

como a variabilidade genética encontra-se distribuída dentro e entre as populações são os marcadores moleculares (SEBBENN, 2001; TELLES et al., 2003). É considerado marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA específico que corresponde a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Dentre os diversos tipos existentes, os marcadores do tipo Microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats*) são baseados em repetições curtas (de 1 a 6 pares) de bases (LITT; LUTY, 1989), repetidas *in tandem* (lado a lado). Eles representam regiões instáveis do genoma, distribuídas ao acaso, formando locos genéticos polimórficos que estão sob alterações mutacionais a taxas maiores que as observadas nas sequências de taxa única.

Os microssatélites são bons marcadores de DNA para estudos com plantas, pois são informativos e podem ser analisados por PCR (Reação de Cadeia Polimerase), baseando-se na amplificação individual de regiões contendo as sequências simples repetidas, utilizando um par de *primers* específicos (de 20 a 30 pares de bases) e complementares às sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado de tamanho diferente corresponde a um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Além disso, são abundantes e uniformemente distribuídos no genoma (JARNE; LAGODA, 1996). Representam a classe mais polimórfica de marcadores moleculares atualmente conhecidos e utilizados (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

As ilhas de microssatélites são regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais, geralmente do tipo adição ou deleção de repetições em taxas mais elevadas que as observadas nas sequências de DNA não repetitivo, sendo que esta taxa pode chegar até 1 a cada 1000 pares de bases (ZUCCHI, 2003). É esta instabilidade que gera um grande número de locos polimórficos, o que é interessante no estudo de populações e mapeamento de genes, favorecendo a mais completa cobertura do genoma.

Rafalski et al. (1996) considera que os SSR são os que se aproximam mais do marcador ideal para estudos de genética de populações. Isso porque possuem um número de alelos e de heterozigosidade muito maior em comparação a outros dados, como por exemplo os gerados por isoenzimas.

Os marcadores SSR começaram a ser utilizados em estudos ecológicos para determinar grau de parentesco entre indivíduos (YANG et al. 1994; MELO, 2000). Também passaram a ser utilizados com objetivo de esclarecer a estrutura genética ou a divisão da

variação entre indivíduos, populações e espécies (WHITE et al., 1999; DAYANANDAN et al., 1999; COLLEVATTI et al., 2001b).

A desvantagem desta técnica é a necessidade de desenvolvimento prévio dos marcadores, o que demanda custos elevados. No entanto estes estudos vem crescendo exponencialmente nos últimos anos e atualmente estes marcadores têm sido utilizados com bastante frequência nos trabalhos de genética de populações de plantas, inclusive espécies do Cerrado.

2.3 Aplicações de microssatélites em estudos no Cerrado brasileiro

O desmatamento tem levado à perda de variabilidade genética de muitas espécies do Cerrado (MARTINS et al., 2006). As alterações antrópicas reduzem a variabilidade genética das espécies por efeito fundador ou gargalo (*bottleneck*), deriva genética, restrição do fluxo gênico e aumento da endogamia, do isolamento e divergência genética entre populações. A endogamia pode conduzir à fixação de alelos deletérios, levando certas populações presentes neste habitat à extinção (VENCOVSKY, 1987; COLLEVATTI et al., 2001a; ZUCCHI, 2003; MORAES et al., 2007).

Os investimentos para estudos no Cerrado Brasileiro vêm ganhando importância somente nos últimos anos. Ainda são espécies para as quais se possui pouco conhecimento bioecológico básico, já que a maior parte do interesse nas pesquisas tradicionalmente tem se voltado para os Biomas de florestas tropicais (MORAES et al., 2007). Os resultados obtidos, vêm apontando algumas direções importantes para se tomar como referência para as ações de minimização dos impactos ambientais nesses ecossistemas (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998).

Marcadores SSR têm sido desenvolvidos para diversos tipos de estudos com espécies típicas do Cerrado brasileiro, como *Caryocar brasiliense* Camb (COLLEVATTI et al., 1999), *Copaifera langsdorffii* Desf. (CIAMPI et al, 2000) *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f ex S. Moore (BRAGA et al, 2007), *Lychnophora pinaster* Mart (HABER et al., 2009), *Anacardium humile* Saint Hill (GRANDO, 2009), *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (TELLES et al., 2011), *Qualea grandiflora* Mart (RITTER et al., 2012) dentre outras.

As finalidades de estudo são bastante variáveis. Enquanto alguns se voltam para a ecologia reprodutiva de espécies de grande interesse econômico, como *Caryocar brasiliense* Camb (COLLEVATTI et al., 1999, 2001a, 2001b, 2003), outros visam a caracterização e coleta de acessos para uso em programas de pré-melhoramento genético, como *Eugenia dysenterica* DC (ZUCCHI, 2003). No entanto, resultados importantes foram obtidos em

trabalhos voltados para conservação de populações de espécies típicas do Cerrado, como *Dipteryx alata* Vogel (SOARES et al., 2008, TARAZI et al, 2010), *Copaifera langsdorffii* Desf. (TARAZI, 2009; SOUZA, 2011), *Hymenaea stygonocarpa* Mart. ex. Hayne (MORENO et al, 2009), *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (MOREIRA et al., 2009), *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f ex S. Moore (SILVA, 2010), dentre outras.

Para realizar estudos de variabilidade genética a partir de marcadores microssatélites, é preciso considerar dois diferentes aspectos de diversidade, segundo Frankel et al. (1996): a riqueza alélica, medida através do número total de alelos na população ou amostra (A) e a equitabilidade na frequência dos diferentes alelos presentes na população, medida pelo coeficiente de diversidade gênica (H_e).

Outros índices que também podem ser utilizados são a heterozigosidade observada (H_o), que segundo Weir (1996) é um importante indicador de diversidade genética, visto que cada heterozigoto carrega alelos diferentes e representa melhor a variação existente em populações autógamas e alógamas; o número de alelos por loco, para caracterizar e comparar os níveis de variação genética nas populações (CONTE, 2004); e o índice de fixação de Wright (f) que mede o excesso ou deficiência de heterozigotos em relação ao esperado no modelo equilíbrio de Hardy Weinberg. Segundo Futuyma (1992) as discrepâncias entre uma população “ideal” de Hardy Weinberg e as populações reais são os ingredientes da evolução.

Além destes índices, leva-se em consideração o conteúdo de informação polimórfica (PIC) que indica a qualidade do marcador utilizado. O valor do PIC varia de 0 para perfis monomórficos, até 1 para perfis altamente polimórficos. Marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos e valores inferiores a 0,25 são tidos como pouco informativos (BOTSTEIN et al., 1980).

A análise dos resultados obtidos com este tipo de estudo, permite, segundo Moreno (2009): (i) identificar e compreender o sistema sexual e reprodutivo, (ii) avaliar possíveis ocorrências de hibridização ou introgressão nas populações, (iii) estimar riscos genéticos de extinção, (iv) fornecer estratégias de translocação/reintrodução de espécies em programas de recuperação, (v) identificar populações vulneráveis ou prioritárias para conservação, (vi) estimar o tamanho efetivo populacional e (vii) determinar a área mínima viável de reservas, entre outros.

Segundo Moreno (2009), os estudos recentes têm adotado abordagens amplas para entender de que forma a diversidade genética é gerada dentro das populações e quantificar com maior precisão as possíveis distâncias de fluxo gênico das espécies via pólen e sementes,

assim como estudar o fluxo gênico histórico e contemporâneo. Também busca-se detectar a existência de propagação assexuada dentro de populações e suas interferências nos índices de diversidade genética para poder aplicar de forma conjunta estes conhecimentos a fim de delinear eficientes estratégias de conservação genética em longo prazo (KAGEYAMA, 2003; ZUCCHI et al., 2005; MARTINS, et al. 2006; AZEVEDO, 2006 entre outros).

2.4 Considerações Finais

A variação genética das espécies é essencial para sobrevivência de populações ao longo das gerações, assim como a compreensão dos padrões de distribuição desta variabilidade, permite entender os efeitos da fragmentação de habitats que colocam as espécies em risco de extinção. Os estudos utilizando marcadores do tipo microssatélites (ainda limitado pelos custos elevados) vêm crescendo nos últimos anos e se mostrando vantajosos, permitindo adotar abordagens amplas no entendimento da variabilidade genética das espécies, atingindo seus propósitos de fornecer subsídios para programas de conservação e manejo, permitindo o uso sustentável de recursos.

Referências

AVISE, J. C. **Molecular markers: natural history and evolution**. London: Springer, 1994. 532 p.

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

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

BRAGA, A.C., REIS, A.M.M., LEOI, L.T., PEREIRA, R.W., COLLEVATTI, R.G., Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, n. 7, p. 53–56, 2007.

CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) Leguminosae – Caesalpinoideae e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco. **Boletim de Pesquisa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v. 16, p. 1-40, 2000.

- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.A.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, Cary, v.83, p.748-756. 1999.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, Cary, v. 86, p. 60-67. 2001a.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 349-356. 2001b.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 105-115, 2003.
- CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**. 124 p. 2004. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.
- DAYANANDAN, S., DOLE, J., BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1585-1592, 1999.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 220 p.
- FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p.229
- FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- GRANDO, C. **Aspectos da demografia do cajueiro-do-campo (*Anacardium humile*) em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo e construção de bibliotecas enriquecidas de microssatélites para a espécie** 77 p. 209. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2009.
- GUILLOT, GI., MORTIER, F.; ESTOUP, A. Geneland: a computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n.4, p. 712-715, 2005.
- HABER, L.H., CAVALLARI, M.M., SANTOS, F.R., MARQUES, M.O., GIMENES, M.A., ZUCCHI, M.I. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora pinaster*: a study for the conservation of a native medicinal plant. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.9, n.3, p. 811-814, 2009

HOLDEREGGER, R., WAGNER, H.H A brief guide to landscape genetics. **Landscape Ecology**, New York, v. 21, p. 793–796. 2006

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

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA F.B.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n.32, p. 65-70, 1998

KAGEYAMA, P.Y. In: KAGEYAMA, P.Y.; OLIVEIRA, R.E.; MORAES, L.F.O.; ENGEL, V.E.; GANDARA, F.B. (Eds.). **Biodiversidade e Restauração da Floresta Tropical**. Botucatu: FEPAP, 2003. p.27-48

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

MANEL, S., SCHWARTZ, MK., LUIKART, G., TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.18, p. 189–197, 2003.

MARTINS, K.; CHAVES, L.J; BUSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y.. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, Arlington, v.7, p.957-969, 2006.

MELO, V. J. R. **Determinação de paternidade em pomares de sementes de *Eucalyptus* com marcadores microssatélites**. 183 p. 2000. Tese (Mestrado) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

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

MOREIRA, P.A., FERNANDES, G.W., COLLEVATTI, R.G. Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. **Forest Ecology and Management**, Ringwood, v.258, p. 2690–2695, 2009.

MORENO, M.A.; TARAIZI, R.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.37, p. 513-523, 2009.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. 5th ed. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

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

RAFALSKI, D.J.A. et al. Generating and using DNA markers in plant. In: BIRREN, B.; LAI, E. **Non-mammalian genomic analysis: a practical guide**. New York: Academic, 1996. p.75-134.

RITTER, L.M.O.; BAJAY, M.M.; MONTEIRO, M.; SOUZA, R.G.V de C.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae), typical species of Brazilian Cerrado. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.99, n.3, p.97-98, 2012.

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

SILVA, M.C. **Diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética espacial e fluxo gênico de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth & Hook ex S. Moore no Cerrado**. 162 p. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

SOARES, T.N., CHAVES, L.J., TELLES, M.P.C., DINIZ-FILHO, J.A.F., RESENDE, L.V. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, Netherlands, v.132, p. 9-19, 2008.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R.(Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 172-192.

SOUZA, R.G.V.C e. **Importância da conservação *in situ* de *Copaifera langsdorffii* Desf. em remanescentes de Cerrado de propriedades particulares rurais**. 77p. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2011.

STORFER, A., MURPHY, M.A., GOLDBERG, C.S., ROBINSON, S., SPEAR,S.F., DEZZANI, R., DELMELLE, E., VIERLING, L., WAITS, L.P. Putting the ‘landscape’ in landscape genetics. **Heredity**, London, v. 98, p. 128-142, 2007.

TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no Cerrado**. 139p. 2009. Tese. (Doutorado em Genética) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2009.

TARAZI, R., MORENO, M.A., GANDARA, F.B., FERRAZ, E.M., MORAES, M.L.T., VINSON, C.C., CIAMPI, A. Y., VENCOVSKY, R.; KAGEYAMA, P.Y. High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian Cerrado fruit tree *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.33, n.1, p. 78-85, 2010.

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

TELLES, M.P.C., PEIXOTO, F.P., LIMA, J.S., RESENDE, L.V., VIANELLO, R.P., WALTERS, M.E.M.T.; COLLEVATTI, R.G. Development of microsatellite markers for the endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n.1, p. 321-325, 2011.

TORRES, R. A. Novas fronteiras da biologia da conservação: a era da genômica. **Natureza e Conservação**, Rio de Janeiro, v. 2, p.16-18, 2003.

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

YANG, G. P.; MAROOF, M. A. S.; XU, C. G.; ZHANG, Q. F.; BIYASHEV, R. M. Comparative-analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Molecular and General Genetics**, Heildelberg, v. 245, n.2, p. 187-194, 1994.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**: methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, Oxford, n.11, p.899-1.909, 1999.

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

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

3 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *QUALEA GRANDIFLORA* MART (VOCHYSIACEAE), ESPÉCIE TÍPICA DO CERRADO BRASILEIRO²

Resumo

Marcadores moleculares do tipo microsatélites foram desenvolvidos para investigar a diversidade genética e estrutura populacional de *Qualea grandiflora* Mart, espécie típica do Cerrado brasileiro. Oito microsatélites foram isolados, utilizando um protocolo de clonagem e enriquecimento. Estes locos foram testados em uma população de 109 indivíduos de *Q. grandiflora* Mart, coletados num fragmento de Cerrado em uma propriedade particular (Fazenda Marimbondo) em Brotas, São Paulo. O número de alelos por loco variou de 7 a 19, enquanto a média da heterozigosidade observada foi de 0,568 e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) teve média de 0,799. Os marcadores desenvolvidos mostraram-se altamente polimórficos, indicando sua aplicabilidade em estudos de diversidade genética de populações de *Q. grandiflora* Mart.

Palavras-chave: Microsatélites; *Qualea grandiflora* Mart; Cerrado

Abstract

Microsatellite primers were developed to investigate genetic diversity and population structure of *Qualea grandiflora* Mart, a typical species of Brazilian Cerrado. Eight microsatellite loci were isolated using an enrichment cloning protocol. These loci were tested on a population of 110 individuals of *Q. grandiflora* Mart collected from a Cerrado fragment in São Paulo State, Brazil. The loci polymorphism ranges from 7 to 19 alleles and the average heterozygosity value is 0.568, while the average Polymorphic Information Content (PIC) is 0.799. The developed markers were found to be highly polymorphic, indicating their applicability to studies of population genetic diversity.

Keywords: SSR; *Qualea grandiflora* Mart; Cerrado

3.1 Introdução

Estimativas recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelam que o Cerrado no Brasil foi reduzido a aproximadamente 50% de sua área original. Consequentemente há necessidade imediata de se gerar subsídios para programas de conservação, visto que as alterações antrópicas levam à perda de variabilidade genética.

Os estudos em genética têm sido de grande valia nos trabalhos de populações naturais, devido à sua capacidade de descrever a variação genética em populações e estudar os mecanismos de manutenção dessa variabilidade (NEI, 1987). Embora ainda escassos para espécies de Cerrado, e muitas vezes voltados para as que possuem maior potencial

² Artigo publicado: RITTER, L.M.O. et al. 2012. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae), a typical species of Brazilian Cerrado. **American Journal of Botany**: 99(3), e97-e98 doi:10.3732/ajb.1100405

econômico, resultados importantes no âmbito da conservação, foram obtidos para espécies como a copaíba - *Copaifera langsdorffii* Desf. (TARAZI, 2009; SOUZA, 2011), o jatobá do Cerrado - *Hymenaeae stygonocarpa* Mart. ex Hayne (MORENO et al., 2009) e o ipê amarelo – *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth & Hook ex S. Moore (SILVA, 2010), dentre outras.

Nos últimos anos vem crescendo o número de estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares Microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR). Estes marcadores são baseados em repetições curtas (de 1 a 6 pares) de bases (LITT; LUTY, 1989), repetidas lado a lado. Representam regiões instáveis do genoma que estão sob alterações mutacionais a taxas maiores que as observadas nas sequências de taxa única.

A instabilidade dos microssatélites resulta em marcadores altamente polimórficos, multialélicos, que são extremamente úteis em estudos de genética de populações arbóreas tropicais, pois podem ser analisados por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), detectando-se diferentes alelos em um loco, além de abundantes e uniformemente distribuídos no genoma (JARNE; LAGODA, 1996). O custo para construção das bibliotecas genômicas, clonagens e sequenciamentos necessários para o desenvolvimento dos *primers* é relativamente elevado, porém seu uso tem se tornado cada vez mais acessível devido às inúmeras vantagens da utilização dos SSR.

Este trabalho teve por objetivo desenvolver marcadores microssatélites para estudos genéticos com *Qualea grandiflora* Mart, espécie de elevada importância econômica e ecológica do Cerrado, ocorrente nas fisionomias *strictu senso*, cerradão e mata de galeria.

3.2 Material e Métodos

O DNA genômico total de *Q. grandiflora* Mart foi extraído de folhas frescas de um indivíduo (registro no herbário HUPG – PR: Ritter LMO, HUPG, 17891) segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1990) adaptado (Anexo A), utilizando-se tampão CTAB em concentração de 3% (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

A construção da biblioteca genômica enriquecida para o desenvolvimento dos iniciadores foi realizada no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento de Plantas do departamento de Genética da Esalq/USP, sob coordenação do professor Dr. José Baldin Pinheiro. Foi seguido o protocolo adaptado de Billotte et al. (1999), utilizando-se uma concentração de DNA de 250 ng/ μL = 5 μL , conforme etapas a seguir.

A enzima Rsa (Invitrogen®) foi utilizada (6,0 μl) para digerir o DNA genômico de *Q. grandiflora* Mart, na concentração de 10 u/ μL , 10 μL tampão (fornecido pelo fabricante da enzima) e 50 μL água Mili-Q autoclavada. A digestão foi verificada por meio de eletroforese

em gel de agarose a 1,2% durante 1,5 horas a 60 V e o material foi incubado a 37° C por 16 horas.

O produto da digestão foi ligado aos adaptadores *Rsa21* (5'CTCTTG CTTACGCGTGGACTA3') e *Rsa 25* (5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA3') para garantir que todos os fragmentos digeridos tivessem uma terminação comum e conhecida. Esta reação foi realizada com 3µL de DNA digerido, 1,5µL de *Rsa 21*, 1,5µL de *Rsa 25*, 2µL da enzima T4 DNA ligase (1u/µL), 5µL de tampão (fornecido pelo fabricante da enzima) e 12µL água Mili-Q autoclavada e incubada por 2 h a 20°C em termociclador. Em seguida realizou-se pré-amplificação via PCR para aumentar a quantidade de fragmentos ligados aos adaptadores.

Todas as amplificações de PCR foram realizadas em 25 mL de volume de reação constituído de tampão [20 mM] Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂] e contendo 20 ng de DNA genômico, 0,8 mM de cada *primer*, 0,2 mM dNTPs e 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®). As reações de PCR foram feitas em termociclador (BIO-RAD My Cycler). O programa de amplificação consistiu em um passo inicial de desnaturação a 94 ° C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos de amplificação [94 ° C (1 minuto), 1 minuto a uma temperatura específica de anelamento de cada par de *primer*, 72 ° C (1 minuto)] e um passo de alongação final a 72 ° C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo Syber Safe, utilizando uma voltagem de 110 V por 1 hora. O Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas Life Sciences) foi utilizado como marcador de peso molecular.

Em seguida foram selecionados os fragmentos de DNA purificados que continham microssatélites, utilizando-se de *beads* magnetizadas (Promega) e sondas biotinizadas, contendo repetições de dinucleotídeos CT e GT (biotIII[CTT]10, biotIII[TA]10 e biot III[GT]100. Os fragmentos contendo microssatélites foram amplificados via PCR e submetidos à eletroforese em gel de agarose, seguindo as especificações já citadas.

Em seguida, os fragmentos foram ligados a um vetor de clonagem pGem - TVector (kit pGem-T Vector System I -Promega). A ligação foi feita através de reação a 4°C por 15 horas, contendo 10 µL de tampão, 1 µL de plasmídeo, 1 µL da enzima ligase (todos componentes fornecidos pelo kit) e 8 µL dos fragmentos. Células competentes de *Escherichia coli* foram utilizadas (100 µL, adicionadas a 4 µL de fragmentos ligados ao vetor e deixadas sobre gelo durante 20 minutos). Assim as células sofreram choque térmico, sendo mergulhadas em banho-maria a 42°C por dois minutos, sendo retiradas e colocadas no gelo por 5 minutos. Após o choque térmico, em câmara de fluxo, adicionou-se 450 µL de meio LB

(0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl em água ultrapura, com pH 7,0) autoclavado e pré-aquecido a 37°C. O material permaneceu em estufa a 37°C por 50 minutos.

Após a incubação, o tubo contendo as células foi centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm, e aproximadamente 350 µL do sobrenadante foi descartado. O volume restante de 60 µL, incluindo o pellet, foi aliqotado sobre placa de Petri contendo meio LB sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de Select Agar em água ultrapura, com pH 7,0) contendo 100 µg/ml de ampicilina. Também aliqotou-se na placa de Petri 60 µL de 20% p/v IPTG e 60 µL de 2% p/v X-GAL. As placas de Petri foram deixadas em estufa a 37°C por 15 horas. Depois do tempo de crescimento das colônias, as de coloração branca foram selecionadas e colocadas em poços de microplaca do tipo ELISA (Costar) contendo 140 µL de meio 2YT-HMFM (1,6% p/v de triptona, 1% p/v de extrato de levedura, 0,5% p/v de NaCl, 0,0076% p/v de MgSO₄ (7H₂O), 0,045% p/v de Citrato de Sódio, 0,09% p/v de (NH₄)₂SO₄, 4,4% p/v de glicerol, 0,18% p/v de KH₂PO₄ e 0,47% p/v de K₂HPO₄ em água ultrapura). Em seguida foi realizada nova amplificação via PCR e verificação em gel de agarose, seguindo as especificações já citadas anteriormente. As colônias foram armazenadas em freezer (-80° C).

Após a seleção dos fragmentos contendo clones positivos para SSR os plasmídeos foram extraídos e sequenciados. Foi realizada uma reação com 1µg do plasmídeo, 2 µL do Mix Bid Dye (Applied Biosystem) e água MilliQ para completar 20 µL. As placas contendo os plasmídeos extraídos foram congeladas a -20°C.

Antes do sequenciamento foi realizada ainda uma etapa de purificação. A cada poço da placa foram adicionados 80µL de isopropanol 65%. Imediatamente antes do sequenciamento as amostras foram desnaturadas em termociclador, a 90°C por três minutos, e depois imediatamente colocadas sobre gelo por cinco minutos. A reação de sequenciamento foi preparada em água ultrapura autoclavada com 4 µL de plasmídeo, 0,5 µM de *primer* SP6, 2 µL de Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e 2 µL de tampão Save Money (preparado com 10% (v/v) de MgCl₂, 50 mM e 20% (v/v) de Tris HCl pH 9,0 em água ultrapura autoclavada). O sequenciamento foi realizado no Centro de Citricultura do Instituto Agrônômico em Cordeirópolis. Utilizou-se o sequenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram transformada em formato "FASTA" pelo programa BioEdit Sequence Aligment Editor (HALL, 1999) e os trechos referentes ao vetor e ao adaptador foram excluídos.

O programa Websat (MARTINS et al., 2009) permitiu a identificação de microssatélites nas sequências obtidas. Os parâmetros utilizados para a identificação de microssatélites foram os seguintes: microssatélites compostos por motivos dinucleotídeos devem ter no mínimo sete repetições do motivo, microssatélites compostos por motivos trinucleotídeos devem ter no mínimo cinco repetições do motivo e microssatélites compostos por motivos tetranucleotídeos (ou mais) deveriam ter no mínimo três repetições do motivo.

O programa Primer3 (ROZEN; SKATSKY, 2000) foi utilizado para o desenho dos *primers*. Os critérios considerados foram: temperatura de anelamento (variando de 54° a 60° C), conteúdo de Guanina Citosina (GC) entre 40 e 60% e intervalo entre 150 e 250 pares de bases (compatível com a eletroforese em géis de poliacrilamida 7% corados com nitrato de prata).

O software Gene Runner v. 3.1 (SPRUYT; BUQUICCHIO, 1994) foi utilizado para confirmar os valores para cada um dos parâmetros citados e apontar a formação de estruturas secundárias, que são indesejáveis se ocorrerem em temperaturas próximas das temperaturas da reação de PCR. Por fim, o software Chromas 2 (McCARTHY, 1996) foi utilizado para avaliar a qualidade do sequenciamento nas regiões dos iniciadores e dos microssatélites.

Os *primers* foram testados utilizando-se amostras de DNA provenientes de 109 indivíduos de *Q. grandiflora* Mart coletados num fragmento de Cerrado no município de Brotas, SP, conforme dados da Tabela 3.1.

Foram utilizadas cubas verticais de eletroforese com placas de vidro contendo gel de poliacrilamida a 5%. Antes da aplicação das amostras o gel foi submetido a pré-corrída durante 40 minutos, de modo a fornecer uma boa temperatura para a corrida dos fragmentos, que duraram em média uma hora e meia a 95 Watts de potência. Os géis obtidos foram corados em solução de 0,2% de nitrato de prata e a leitura foi feita na forma de bandas. O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10 pb “ladder” – Invitrogen®). Os fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

As estimativas das frequências alélicas, juntamente com o número de alelos por loco, das heterozigosidades observada e esperada foram realizadas com auxílio do programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). O teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo teste exato de Fisher, utilizando o programa TFGA (MILLER, 1997). O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi obtido através do programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

Tabela 3.1 – Coordenadas geográficas e códigos das amostras de *Q. grandiflora* Mart coletadas no fragmento de Cerrado em Brotas, São Paulo

Amostra	Localização geográfica	Amostra	Localização geográfica	Amostra	Localização geográfica
Q1	S22°22'263"/ W48°01'382"	Q64	S22°22'222"/ W48°01'383"	Q120	S22°22'210"/ W48°01'368"
Q2	S22°22'272"/ W48°01'372"	Q65	S22°22'223"/ W48°01'383"	Q122	S22°22'200"/ W48°01'368"
Q3	S22°22'261"/ W48°01'372"	Q67	S22°22'225"/ W48°01'373"	Q123	S22°22'201"/ W48°01'378"
Q4	S22°22'264"/ W48°01'372"	Q71	S22°22'215"/ W48°01'371"	Q124	S22°22'201"/ W48°01'370"
Q5	S22°22'263"/ W48°01'374"	Q79	S22°22'195"/ W48°01'371"	Q125	S22°22'202"/ W48°01'378"
Q8	S22°22'262"/ W48°01'371"	Q80	S22°22'195"/ W48°01'371"	Q132	S22°22'204"/ W48°01'376"
Q9	S22°22'251"/ W48°01'383"	Q84	S22°22'196"/ W48°01'382"	Q126	S22°22'195"/ W48°01'384"
Q12	S22°22'252"/ W48°01'386"	Q85	S22°22'197"/ W48°01'384"	Q127	S22°22'197"/ W48°01'382"
Q13	S22°22'255"/ W48°01'382"	Q87	S22°22'198"/ W48°01'381"	Q128	S22°22'194"/ W48°01'381"
Q14	S22°22'257"/ W48°01'393"	Q90	S22°22'219"/ W48°01'389"	Q129	S22°22'192"/ W48°01'382"
Q19	S22°22'236"/ W48°01'394"	Q91	S22°22'219"/ W48°01'388"	Q130	S22°22'196"/ W48°01'382"
Q22	S22°22'233"/ W48°01'385"	Q92	S22°22'216"/ W48°01'385"	Q131	S22°22'197"/ W48°01'382"
Q23	S22°22'242"/ W48°01'377"	Q93	S22°22'233"/ W48°01'364"	Q133	S22°22'199"/ W48°01'392"
Q24	S22°22'231"/ W48°01'377"	Q94	S22°22'234"/ W48°01'373"	Q134	S22°22'198"/ W48°01'394"
Q25	S22°22'233"/ W48°01'379"	Q95	S22°22'228"/ W48°01'373"	Q136	S22°22'191"/ W48°01'394"
Q26	S22°22'232"/ W48°01'371"	Q96	S22°22'227"/ W48°01'382"	Q138	S22°22'192"/ W48°01'394"
Q42	S22°22'232"/ W48°01'372"	Q97	S22°22'225"/ W48°01'384"	Q139	S22°22'193"/ W48°01'396"
Q30	S22°22'223"/ W48°01'364"	Q98	S22°22'212"/ W48°01'375"	Q140	S22°22'183"/ W48°01'397"
Q31	S22°22'221"/ W48°01'365"	Q99	S22°22'213"/ W48°01'374"	Q201	S22°22'264"/ W48°01'377"
Q34	S22°22'221"/ W48°01'352"	Q100	S22°22'214"/ W48°01'376"	Q202	S22°22'265"/ W48°01'378"
Q37	S22°22'231"/ W48°01'363"	Q102	S22°22'211"/ W48°01'372"	Q203	S22°22'260"/ W48°01'377"
Q38	S22°22'234"/ W48°01'361"	Q107	S22°22'213"/ W48°01'372"	Q 204	S22°22'258"/ W48°01'378"
Q39	S22°22'235"/ W48°01'361"	Q109	S22°22'212"/ W48°01'373"	Q205	S22°22'256"/ W48°01'379"
Q40	S22°22'232"/ W48°01'361"	Q101	S22°22'212"/ W48°01'383"	Q 208	S22°22'255"/ W48°01'399"
Q43	S22°22'233"/ W48°01'368"	Q103	S22°22'212"/ W48°01'382"	Q 209	S22°22'256"/ W48°01'381"
Q46	S22°22'235"/ W48°01'362"	Q104	S22°22'212"/ W48°01'384"	Q 210	S22°22'254"/ W48°01'372"
Q47	S22°22'241"/ W48°01'373"	Q105	S22°22'212"/ W48°01'381"	Q 211	S22°22'243"/ W48°01'362"
Q48	S22°22'241"/ W48°01'373"	Q106	S22°22'213"/ W48°01'381"	Q212	S22°22'234"/ W48°01'352"
Q49	S22°22'251"/ W48°01'373"	Q110	S22°22'217"/ W48°01'387"	Q219	S22°22'231"/ W48°01'355"
Q50	S22°22'251"/ W48°01'372"	Q111	S22°22'227"/ W48°01'397"	Q 213	S22°22'232"/ W48°01'364"
Q51	S22°22'251"/ W48°01'383"	Q113	S22°22'227"/ W48°01'394"	Q214	S22°22'233"/ W48°01'363"
Q53	S22°22'251"/ W48°01'394"	Q114	S22°22'217"/ W48°01'393"	Q215	S22°22'235"/ W48°01'362"
Q59	S22°22'221"/ W48°01'395"	Q115	S22°22'217"/ W48°01'392"	Q216	S22°22'230"/ W48°01'366"
Q60	S22°22'222"/ W48°01'395"	Q116	S22°22'208"/ W48°01'392"	Q217	S22°22'237"/ W48°01'367"
Q61	S22°22'222"/ W48°01'386"	Q117	S22°22'218"/ W48°01'384"	Q218	S22°22'235"/ W48°01'368"
Q62	S22°22'222"/ W48°01'383"	Q118	S22°22'219"/ W48°01'374"		
Q63	S22°22'223"/ W48°01'373"	Q119	S22°22'211"/ W48°01'374"		

3.3 Resultados

Com base no sequenciamento de quatro placas de DNA de *Q. Grandiflora* Mart, contendo 288 clones, foram desenhados 22 pares de *primers*, que foram testados com diferentes amostras de DNA da espécie, sendo que 8 mostraram-se altamente polimórficos e de fácil leitura, sendo então escolhidos para o desenvolvimento dos estudos após terem suas temperaturas de anelamento otimizadas, conforme Tabela 3.2 e Figura 3.1.

Tabela 3.2 - Sequências Forward e Reverse escolhidas para os estudos de diversidade genética de *Q. grandiflora* Mart, temperaturas de anelamento em graus Celsius e número de registro no GeneBank

Primer	Forward	Reverse	T (°C)	GeneBank
Qgr1	CACTGGCGATTCAATTTCTCA	AGCCCAACCGAGTAAACAAG	58	JN230425
Qgr3	GCGACGATGAGTTTCATTAGC	ATGATTGAGAATGGGGGACT	58	JN230426
Qgr4	GATACAATGTCGGGGAGGAC	CCACGTAAAACCTCAATTCATCG	56	JN230427
Qgr7	ATCAGAGCACTCAAGCAACG	CAGCAAACCTAATGGAGGAGGA	58	JN230428
Qgr11	CGCAAAATCCCATCTTATC	TGCTCCTTGAGTGCTGTGA	58	JN230429
Qgr12	GGGCTTTATGTCTTTTGGTTTG	CTTCTTCTTCTCCTCGCAGA	58	JN230430
Qgr13	TGAATGTGTTCCAAACCAAGTG	AAGTGTGCGTGTGCGTGT	54	JN230431
Qgr20	CATGCGTAAGCGTAAAATCTC	TACATTGCCACGGGAGTAAG	58	JN230432

O número de alelos encontrados nas análises variou de 7 a 19 e a Heterozigosidade observada (H_o) variou de 27 a 79% , valores inferiores à Heterozigosidade esperada (H_e), com exceção do loco Qgr1, indicando um elevado número de homocigotos nesta população. Os valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) foram significativos (maiores que 0,5), indicando que os *primers* fornecem elevado grau de informação. Dois oito locos testados, sete estão em desvio do Equilíbrio de Hardy Weinberg (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Índices de diversidade genética em *Q. grandiflora* Mart utilizando 8 locos SSR

Loco	N	H_o	H_e	PIC	EHW
Qgr1	9	0,734	0,68	0,629	0,66
Qgr3	7	0,27	0,77	0,725	0
Qgr4	15	0,552	0,869	0,848	0
Qgr7	19	0,439	0,878	0,859	0
Qgr11	15	0,794	0,893	0,87	0,21
Qgr12	11	0,688	0,881	0,856	0,04
Qgr13	12	0,53	0,821	0,787	0
Qgr20	12	0,538	0,843	0,817	0

N= número de alelos; H_o = Heterozigosidade observada; H_e = Heterozigosidade esperada. PIC= Conteúdo de Informação Polimórfica e EHW= Teste adesão ao Equilíbrio de Hardy Weinberg, onde resultados menores que 0,5 significam desvio do equilíbrio. Ano base: 2010

3.4 Considerações Finais

Os marcadores microssatélites desenvolvidos mostraram-se altamente polimórficos, fornecendo, assim, importante subsídio para continuidade dos estudos de diversidade genética da espécie em *Qualea grandiflora* Mart. O uso destas ferramentas permitirá uma melhor compreensão das características reprodutivas da espécie e conseqüentemente terá um importante papel no aumento de conhecimento acerca da diversidade genética do Cerrado.

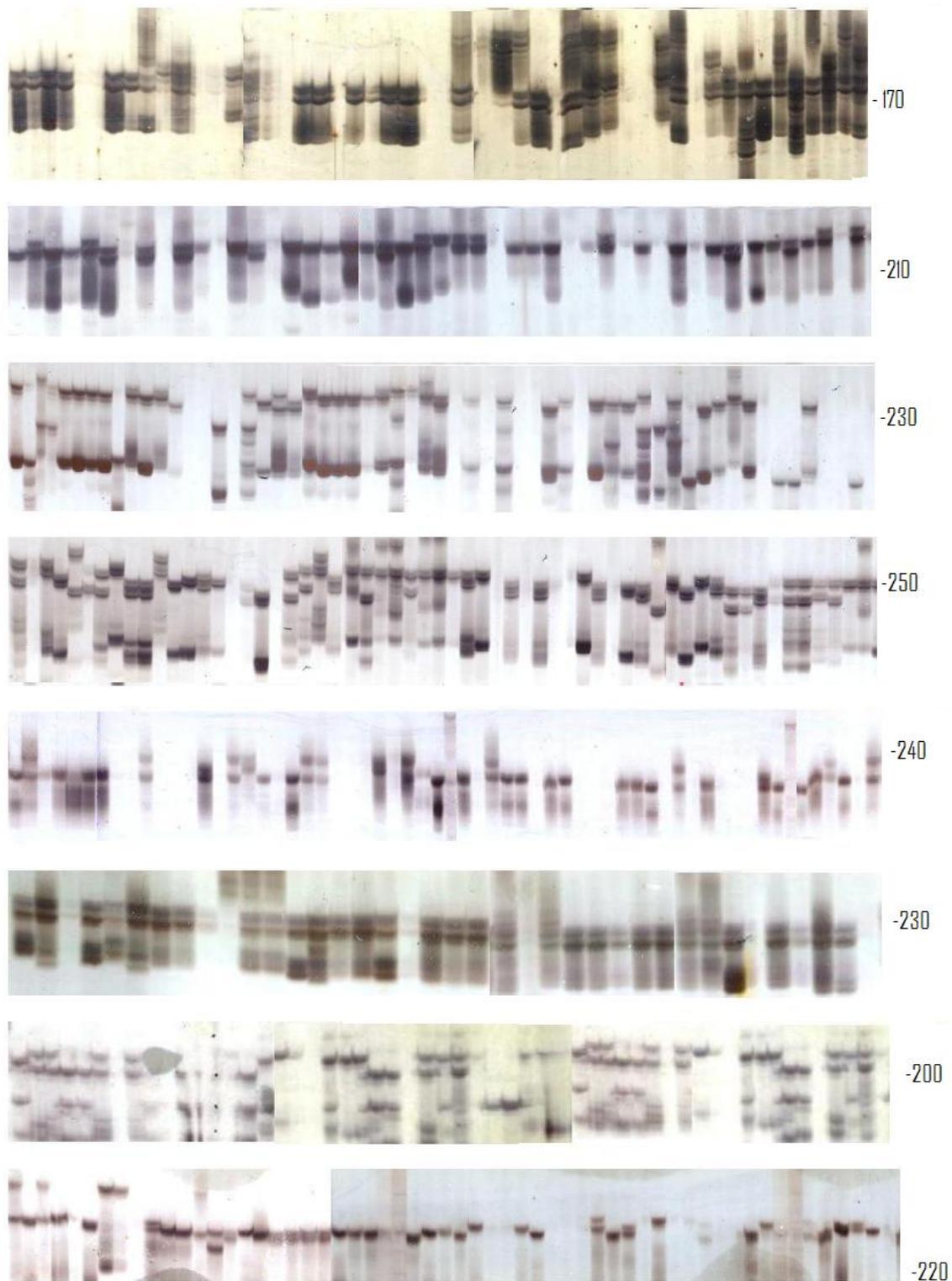


Figura 3.1 - Perfil de oito locos microssatélites desenvolvidos para *Q. grandiflora* Mart. Géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata. Amplitudes alélicas indicadas à direita na altura do traço. De cima para baixo estão géis dos respectivos locos: Qgr1, Qgr3, Qgr4, Qgr7, Qgr11, Qgr12, Qgr13 e Qgr20

Referências

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, C. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Cambridge, v.54, p. 277–288, 1999.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p. 13–15, 1990.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1998. 220 p.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n.41, p. 95-98, 1999.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. **SPAGeDI 1.1**: a program for spatial pattern analysis of genetic diversity. 2003. Disponível em: <<http://ebe.ulb.ac.be/ebe/Software.html>>. Acesso em: 01 mar. 2012.

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

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

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

MARTINS, W.S., LUCAS, D.C.S., NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J.. WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformatics**, Toronto, v.3, n.6, p.282-283, 2009.

McARTHUR, M. **Chromas**. v 2.01. School of Health Science, Griffith University, Australia. 1996-1998. Disponível em: <<http://technelysium.com.au/chromas.html>>. Acesso em: 10 nov 2011.

MILLER, M.P. **TFPGA**: Tools for populations genetics analyses. v 1.3. A Window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, 1997. Disponível em: <<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>> Acesso em: 01 mar. 2012.

MORENO, M.A.; TARAZI, R.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonacarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.37, p. 513-523, 2009.

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

ROZEN, S. SKATSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETS, S.; MISENER, S. (Eds.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. New Jersey: Humana Press, 2000. p. 365-386.

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

SOUZA, R.G.V.C. **Importância da conservação *in situ* de *Copaifera langsdorffii* Desf. em remanescentes de Cerrado de propriedades particulares rurais.** 77 p. 2011. Dissertação. (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2011.

SPRUYT, M.; BUQUICCHIO, F. **Gene Runner** v. 3.01. 1994. Disponível em: <<http://www.generunner.net/>> Acesso em: 10 ago 2011

TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no Cerrado.** 139 p. 2009. Tese. (Doutorado em Genética) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2009.

4 ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *QUALEA GRANDIFLORA* MART NO CERRADO DO ESTADO DE SÃO PAULO

Resumo

Este trabalho trata da estrutura e diversidade genética de uma espécie típica do Cerrado brasileiro, *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae), presente nas diversas fisionomias do bioma. Foram utilizados oito locos microssatélites para analisar 420 amostras de indivíduos adultos pertencentes a quatro populações distribuídas no estado de São Paulo, com objetivo de ampliar o conhecimento genético sobre a espécie, fornecendo subsídios para programas de conservação genética do Cerrado. Os resultados mostraram a ocorrência média de 12,9 alelos por loco, sendo que o número médio de alelos efetivos foi seis, além de terem sido encontrados 26 alelos exclusivos nas populações. A média dos valores de Heterozigosidade esperada foi de 0,803 enquanto de Heterozigosidade observada foi de 0,512. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) variou de 0,708 a 0,801 nos locos estudados. A média dos valores de fixação foi de 0,349 indicando a presença de endogamia nas populações. Não há presença de clones em nenhuma população. O teste de adesão ao Equilíbrio de Hardy Weinberg confirma o desvio de equilíbrio em todas as populações. Há formação de estrutura populacional nas primeiras classes de distância em todas as populações estudadas, variando de 30 a 40 metros e há formação de três possíveis grupos de genótipos. A influência do efeito Wahlund foi variável nas populações (de 8,5% até 53,3%). As estimativas de tamanho efetivo populacional foram baixas (menos de 10 indivíduos) e a área mínima viável estimada em 4 a 184 hectares, considerando estimativas de curto, médio e longo prazos. Os resultados demonstram que a espécie possui elevado potencial para conservação genética *in situ* e que as áreas estudadas devem ser tratadas como Unidades Significativas Evolutivas e como Unidades Independentes para o Manejo.

Palavras-chave: Cerrado; *Qualea grandiflora* Mart; Diversidade genética; Microssatélites

Abstract

In this work we deal with the structure and genetic diversity of a species typical of the Brazilian Cerrado, *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae), found in different physiognomies of this biome. We used eight microsatellite loci to analyze 420 samples of adult individuals from four populations distributed in the state of São Paulo, aiming at broadening the genetic knowledge about the studied species, therefore supporting programs of genetic conservation of the Cerrado. The results showed an average occurrence of 12.9 alleles per locus, while the average number of effective alleles was six. Moreover, 26 exclusive alleles were found in the populations. The average values of expected heterozygosity was 0.803, while the observed heterozygosity was 0.512. The polymorphic information content ranged from 0.708 to 0.801 at the loci studied. The mean fixation was 0.349, therefore indicating the presence of inbreeding within populations. There is no presence of clones in any population. The test of adherence to Hardy Weinberg Equilibrium confirms the deviation from equilibrium in all populations. There is formation of population structure in the first distance classes in all populations studied, ranging from 30 to 40 meters, and there is a formation of three possible genotype groups. The influence of the Wahlund effect varied among populations (from 8.5% to 53.3%). The effective population size estimates were low (less than 10 individuals) and the minimum viable area was estimated between 4 to 184 hectares, taking into account estimates of short, medium and long terms. The results show that this species has potential for *in situ* genetic conservation and that the studied areas should be treated as evolutionary significant units and as independent units for management.

Keywords: Cerrado; *Qualea grandiflora* Mart; Genetic diversity; SSR

4.1 Introdução

O Cerrado é um bioma que comporta diferentes paisagens, constituídas por várias fisionomias de vegetação, vinculadas a fatores físicos e fisiográficos (SILVA; BATES, 2002; FELFILI et al., 2005).

Devido ao seu elevado grau de endemismo, bem como a perda da maioria de sua extensão original, o Cerrado enquadra-se como um *hotspot*, ou seja, uma das áreas de alta biodiversidade mais ameaçada do planeta e tida como prioritária para conservação (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2005). Os hotspots abrigam mais de 60% da vida do planeta, embora ocupem apenas cerca de 2,3% da superfície da Terra (CONSERVATION INTERNATIONAL, 2005).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos com intuito de aprofundar o conhecimento sobre a biodiversidade do Cerrado, visando, dentre outros objetivos adquirir informações genéticas relevantes que possam ser empregadas em programas de conservação genética e melhoramento florestal. Entre eles, enquadra-se o estudo da diversidade genética em populações naturais, que compreende a descrição dos níveis de variação genética mantida dentro das populações, bem como a forma em que a variação genética é dividida nestas (HAMRICK, 1996). Estas informações permitem entender a interação de características da paisagem com processos de microevolução, tais como o fluxo genético e seleção de espécies. Permitem também identificar rupturas dos genes que fluem através de populações sem causas óbvias e sem contatos entre populações previamente isoladas (MANEL et al., 2003).

Espécies arbóreas geralmente apresentam grau relativamente alto de variações genéticas quando comparadas a outras plantas (MITTON, 1983; LEDIG, 1986). Este elevado grau é assumido como um reflexo de recentes eventos históricos e do sistema de reprodução, mais do que um resultado de adaptações ambientais que coletivamente definem a estrutura genética de uma população (LEDIG, 1986).

Este trabalho teve por objetivo analisar a estrutura e diversidade genética de quatro populações de *Qualea grandiflora* Mart em áreas de Cerrado do estado de São Paulo, bem como sugerir estratégias para a conservação da espécie e uso adequado dos recursos genéticos disponíveis.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Áreas de estudo e amostragem

As árvores foram mapeadas por meio de aparelho receptor GPSmap76 CSx (Garmin), configurado no DATUM South American Brazil (SAD 69) e foram marcadas com plaquetas metálicas identificadas por números. Os dados de georreferenciamento foram tratados

utilizando-se os softwares MapSource 6.13.7 (Garmin Ltd) e GPS Trackmaker (Geo Studio Technology).

Com uso de fita métrica, foram escolhidos indivíduos com Circunferência à Altura do Peito (CAP) superior a 15,2 cm (Diâmetro à Altura do Peito equivalente a 5 cm), considerados como adultos (com base em prévias observações em campo, devido à escassez de dados sobre a fenologia e biologia reprodutiva da espécie).

A coleta de tecido foliar foi realizada com auxílio de podão, procurando-se os ramos em estágio intermediário ou jovem, mas como nem sempre estas condições foram encontradas, optou-se pela coleta de 02 folhas em cada estágio verificado nas árvores. O material foliar foi acondicionado em sacos plásticos de polietileno vedados. O transporte foi feito em caixas de isopor com gelo, protegidas por camadas de jornal. Em laboratório as amostras foram armazenadas em geladeira (5°C).

Foram analisadas quatro populações de *Qualea grandiflora* Mart, no estado de São Paulo, sendo três em unidades administradas pelo Instituto Florestal (Assis, Itirapina e Pedregulho) e uma em propriedade particular (Brotas), conforme descrição a seguir.

(i) População Assis: Área de coleta aproximadamente 2,2 hectares localizada próximo à represa do Horto Florestal da Floresta Estadual de Assis (coordenadas 22°36'00''S e 50°24'28''O, 540 metros de altitude). Sua fisionomia é de Cerrado típico (RIBEIRO; WALTER, 1998), com presença de Braquiária e cobertura arbórea média de 46,3% (PINHEIRO; DURIGAN, 2009). Foram coletadas amostras foliares de 113 indivíduos adultos (Figura 4.1).

(ii) População Brotas: Localizada na Fazenda Marimbondo, no município de Brotas (22°22'18''S e 48°01'24''O, 650 metros de altitude), possui fisionomia de Cerrado *strictu sensu* (RIBEIRO; WALTER, 1998) e seu entorno inclui canaviais e pastagens. A área de coleta é de aproximadamente 0,9 hectares (Figura 4.2), onde foram coletadas amostras foliares de 97 indivíduos adultos.



Figura 4.1 - Área de estudo no Horto Florestal em Assis, SP. Em azul os indivíduos de *Q. grandiflora* marcados para coleta foliar



Figura 4.2 – Área de estudo na Fazenda Marimbondo em Brotas, SP. Em azul os indivíduos de *Q. grandiflora* marcados para coleta foliar

(iii) População Itirapina: a área de coleta tem aproximadamente 1,4 hectares, é conhecida como “Cerrado Valério” e localiza-se na Estação Experimental de Itirapina (Figura 4.3), a 750 metros de altitude, sob as coordenadas 22°13’03’’S e 47°50’15’’O. Foram coletadas amostras foliares de 110 indivíduos adultos. A fisionomia é do tipo cerrado (RIBEIRO; WALTER, 1998) caracterizando-se por apresentar flora com elementos do Cerrado *sensu stricto* e de mata, com cobertura arbórea de 50-60%. O estrato arbóreo é composto por indivíduos tortuosos e retos, com alturas médias de 8 a 15 metros.



Figura 4.3 - Área de estudo na Estação Experimental de Itirapina, SP. Em azul os indivíduos de *Q. grandiflora* marcados para coleta foliar

(iv) **População Pedregulho:** Localizada no Parque Estadual Furnas do Bom Jesus, a 1000 metros de altitude, nas coordenadas 20°13'40''S e 47°26'18''O. A área de coleta fica próxima ao alojamento do parque e do centro de visitantes. Possui aproximadamente 0,9 hectares (Figura 4.4), onde foram coletadas amostras foliares de 100 indivíduos adultos. A fisionomia é do tipo Cerrado *sensu stricto* do tipo ralo (RIBEIRO; WALTER, 1998), com solo areno-pedregoso. Possui cobertura arbórea de 5 a 20% e a altura média dos indivíduos varia de 2 a 3 metros.



Figura 4.4 - Área de estudo no Parque Estadual Furnas do Bom Jesus em Pedregulho. Em azul os indivíduos de *Q. grandiflora* marcados para coleta foliar

4.2.2 Extração de DNA e análises genéticas

O DNA das amostras foi extraído segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1990) adaptado (Anexo A), utilizando-se tampão CTAB em concentração de 3% (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Na etapa de amplificação dos locos microssatélites, foi utilizado um coquetel (13 µL) para a realização da PCR composto por 7,5 ng de DNA genômico, 250 µM de dNTPs, 0,5 µM de MgCl₂, tampão para PCR 1X (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, pH 8,3), 2,5 µg / ml de BSA, 0,2 µM de cada *primer* e 1U da enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria®). As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100, utilizando-se o seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 29 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica de cada par de iniciadores por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram segregados em gel desnaturante de poliacrilamida a 5%, em eletroforese de uma hora e trinta minutos em tampão TBE 1X em cuba vertical. Os fragmentos foram observados na forma de bandas, após coloração com nitrato de prata. O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10 pb “ladder” - Invitrogen®). Os fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

Foram utilizados 8 locos microssatélites projetados por Ritter et al. (2012) para *Qualea grandiflora* Mart (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Sequências Forward e Reverse escolhidas para os estudos de diversidade genética de *Q. grandiflora* Mart com suas respectivas temperaturas de anelamento em graus Celsius e o número de registro no GeneBank

Primer	FORWARD	REVERSE	Temp. (°C)	GeneBank
Qgr1	CACTGGCGATTTCATTTCTCA	AGCCCAACCGAGTAAACAAG	58	JN230425
Qgr3	GCGACGATGAGTTTCATTAGC	ATGATTGAGAATGGGGGACT	58	JN230426
Qgr4	GATACAATGTCGGGGAGGAC	CCACGTAAAACCTCAATTCATCG	56	JN230427
Qgr7	ATCAGAGCACTCAAGCAACG	CAGCAAACCTAATGGAGGAGGA	58	JN230428
Qgr11	CGCAAAATCCCCATCTTATC	TGCTCCTTGAGTGCTGTGA	58	JN230429
Qgr12	GGGCTTTATGTCTTTTGGTTTG	CTTCTTCTTCTTCCTCGCAGA	58	JN230430
Qgr13	TGAATGTGTTCCAAACCAGTG	AAGTGTGCGTGTGCGTGT	54	JN230431
Qgr20	CATGCGTAAGCGTAAATCTC	TACATTGCCACGGGAGTAAG	58	JN230432

4.2.3 Análise de dados

Com a finalidade de se conhecer a distribuição dos indivíduos nas áreas estudadas, foi calculado o índice de agregação de Clark-Evans conforme Clark e Evans (1954), utilizando-se

o software SGS (DEGEN et al., 2001b). Esse índice de agregação, baseado no índice R , estimado para diferentes classes de distância geográfica, permite a inferência do padrão de distribuição espacial das árvores, em cada uma das populações. Os valores de R indicam: <1 , distribuição agregada; 1 , distribuição aleatória; e >1 , associam-se à distribuição regular (DEGEN, 2000; DEGEN et al., 2001a).

Para a análise da estrutura genética espacial (EGE) das populações, foi utilizado o programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). A caracterização da distribuição espacial dos genótipos dentro das populações foi realizada a partir das estimativas dos coeficientes de coancestria recente (θ_{xy}) com base em Loiselle et al. (1995). Foram realizadas 10.000 permutações sobre a localização de cada genótipo e sobre locos a fim de se obter intervalos de confiança a 95%.

Este software também foi utilizado para calcular as estimativas das frequências alélicas, do número de alelos por loco (A), das heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e) e dos índices de fixação (F). Para verificar a significância de F foi realizado o procedimento de 10.000 permutações sobre os locos ao nível de 5% de probabilidade, utilizando correção de Bonferroni. Para comparação das médias de A , H_o , H_e e F entre populações foi calculado um intervalo de confiança a 95% a partir do erro padrão utilizando o método Jackknife sobre locos.

O teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo teste exato de Fisher, utilizando o programa TFGA (MILLER, 1997), além do cálculo da distância genética entre as populações, conforme Nei (1987). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado através do programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

A correção do efeito Wahlund nas populações foi feita utilizando-se uma relação entre as estatísticas f , conforme Bittencourt e Sebben (2007), onde a fórmula de Wright (1965) é modificada para: form. (1)

$$f = 1 - \left[\frac{(1-f)}{(1-\theta_{xy})} \right] \quad (1)$$

A estrutura de grupos dos indivíduos (K) foi analisada com o software Structure (PRITCHARD et al., 2000). O algoritmo contido no programa constrói clusters genéticos a partir de uma coleção de genótipos multilocos individuais, estimando para cada indivíduo as frações do seu genoma que pertencem a cada cluster. Em contraste aos métodos que usam distâncias genéticas, informações fenotípicas, locais de amostragem e origem suposta dos indivíduos, não necessitam ser especificadas para o algoritmo a ser aplicado (ROSENBERG

et al, 2002). A determinação do número K utiliza valores de ΔK , segundo Evanno et al. (2005).

O tamanho efetivo populacional de variância (N_e) foi estimado conforme expressão derivada por Cockerham (1969), envolvendo as estimativas do índice de fixação (F) e do coeficiente de coancestria médio (θ) da geração sob consideração: form. (2)

$$N_e = \frac{0,5}{\theta(n-1/n) + [(1 + F)/2n]} \quad (2)$$

A área mínima viável (AMV) para conservação genética *in situ* foi estimada em função do tamanho efetivo de referência ($N_{e(ref)} = 50, 500$ e 1000) proposto por Lynch (1996), em que N_e/n = relação entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral e d = densidade de indivíduos por hectare: form. (3)

$$AMV = \frac{N_{e(ref)}}{d(N_e/n)} \quad (3)$$

Através do software FSTAT (GOUDET, 2001), foram estimadas as divergências genéticas com a estatística F de Weir e Cockerham (1984) e as estatísticas de Nei (1987) ($\theta_p = F_{st}$) de populações subdivididas (H_t = diversidade genética total, G_{st} = diversidade genética entre e H_s = diversidade genética dentro). O índice F_{st} (θ_p), foi substituído por R_{st} e G_{st}' para conhecer a magnitude do fluxo gênico realizado e standardizar o valor de G_{st} (Hedrick, 2005).

O fluxo gênico aparente (N_m) entre populações foi estimado de acordo com o modelo proposto por Crow e Aoki (1984), form. (4)

$$Nm = \left(\frac{1}{4x}\right) \left[\left(\frac{1}{F_{st}}\right) - 1\right] \quad (4)$$

Utilizou-se o programa BOTTLENECK versão 1.2 (PIRY et al. 1999) para testar se as populações encontram-se em Equilíbrio entre Mutação e Deriva genética, conforme metodologia descrita em Cornuet e Luikart (1996). Estes testes baseiam-se no princípio de que populações que experimentaram uma recente redução de seu tamanho efetivo populacional exibem uma correlacionada redução do número de alelos e da diversidade gênica (H_e ou heterozigidade esperada pelas proporções de EHW) nos locos polimórficos. No entanto, o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigidade (H_e), o que faz com que H_e se torne maior do que a heterozigidade esperada sob Equilíbrio entre

Mutação e Deriva (H_{eq}) porque H_{eq} é calculada a partir do número de alelos (e do tamanho amostral). Ambas as medidas, de heterozigiosidade (H_e) e de heterozigiosidade esperada de equilíbrio (H_{eq}) referem-se à diversidade gênica de Nei (1987) e não à proporção de heterozigotos observada (H_o). Com isso, não se está testando para um excesso de heterozigotos ($H_o > H_e$) e sim para um excesso de heterozigiosidade ($H_e > H_{eq}$).

O programa BOTTLENECK considera dois modelos de mutação independente. Um deles é o Modelo de Passos de Mutação (Stepwise Mutation Model, OHTA; KIMURA, 1973), que é atualmente o mais aceito para explicar as características evolutivas dos microssatélites. Ele sugere que o ganho e a perda de unidades de repetição se dão em igual probabilidade, admitindo uma simetria no processo, independentemente do tamanho da repetição. Por isso, dois alelos que diferem em somente uma repetição são mais relacionados (dividem um ancestral comum) do que aqueles que diferem em mais repetições. O segundo modelo é o de Mutação de Alelos Infinitos (KIMURA; CROW, 1964), segundo o qual uma mutação envolve qualquer número de repetições *in tandem* e sempre resulta em um estado alélico previamente não encontrado na população.

Segundo Moraes e Derbyshire (2003), o excesso de diversidade gênica tem sido demonstrado apenas para locos que evoluem sob o Modelo de Mutação de Infinitos Alelos. Se o loco evoluir sob o Modelo de Passos de Mutação, haverá situações em que o excesso de heterozigiosidade não será observado (CORNUET; LUIKART, 1996, PIRY et al. 1999). No entanto, poucos locos seguem o Modelo de Passos de Mutação e tão logo os locos desviem desse modelo em direção ao Modelo de Infinitos Alelos, eles exibirão um excesso de heterozigiosidade como consequência de gargalo populacional. O software usa ambos os modelos independentemente, por representarem os dois modelos extremos de mutação ao longo de um continuum de modelos possíveis (CHAKRABORTY; JIN, 1992). Todos os locos se adequam a um modelo mutacional em algum lugar entre esses dois modelos extremos. A significância do excesso de diversidade gênica ($H_e > H_{eq}$) foi avaliada através do teste signed rank de Wilcoxon, por ser o mais robusto quando utilizado para menos de 20 locos (PIRY et al. 1999), baseando-se em 5.000 replicações.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Distribuição Espacial e Classes Diamétricas

As populações de *Qualea grandiflora* Mart das quatro áreas de estudo apresentam-se em alta densidade de indivíduos por hectare, ocorrendo de forma agregada. Durigan et al. (2002) e Salustio et al. (2008) encontraram resultados bastante similares para a espécie em

áreas vizinhas de cerrado em Brotas e Itirapina. A distância média do vizinho mais próximo foi de 5,55 metros (Tabela 4.2). Durigan et al. (2002), estudando uma área de cerrado em Brotas, aponta a ocorrência de 25 espécies (entre 78) com distribuição agregada. Associa esta ocorrência ao modo de regeneração dos indivíduos após incêndios ou cortes. Segundo Condit et al. (2000), esta é uma condição comum para a maioria das espécies vegetais tropicais.

Sabe-se que a estrutura populacional de uma espécie (o conjunto de características demográficas e genéticas) é resultado de mecanismos evolutivos e ecológicos (MARTINS, 1987) e pode fornecer informações sobre processo de regeneração (CLARK, 1994), ocorrência de perturbações e a forma como a espécie está explorando o ambiente (HARPER, 1977).

Tabela 4.2 - Dados demográficos das populações de *Qualea grandiflora* Mart estudadas no estado de SP

População	Área(ha)	N	R_0	R	D	DAP
Assis	2,2	113	0,698*	7,21	51,4	16,4
Brotas	0,9	97	0,542*	6,48	107,8	10
Itirapina	1,4	110	0,447*	4,21	78,6	17,3
Pedregulho	0,9	100	0,723*	4,32	111	17,6

N = número de indivíduos coletados; R_0 = índice de agregação; * significativo R = Distância do vizinho mais próximo. D = Densidade média por hectare; DAP = Diâmetro à altura do peito (média da população em cm). Ano base: 2010

Com relação às classes diamétricas, os histogramas de Brotas e Pedregulho apresentaram curvas resultantes do tipo “J-invertido” (Figura 4.5), onde observa-se maior quantidade de indivíduos com DAP menor que 10 cm e menor quantidade de indivíduos nos maiores intervalos de classes, sugerindo um balanço positivo entre recrutamento e mortalidade. Este padrão corresponde a uma população com capacidade de auto-regeneração, com representantes em todas as classes de tamanho e em maior número nas classes menores. Em literatura, assimila-se ao que se denomina “seleção natural direcional”, quando determinado fenótipo é favorecido e tende a aumentar sua frequência na população.

Segundo Barbour et al. (1987), esta é a estrutura de tamanho mais comumente registrada em espécies arbóreas, com muitos indivíduos nas menores classes de tamanho que, individualmente, representam uma pequena parte do total da biomassa da população e poucos indivíduos nas classes superiores, que individualmente representam uma grande parte da biomassa total da população. Um estudo de Bernasol e Lima-Ribeiro (2010), considerando um fragmento de Cerrado *sensu stricto* em uma reserva ecológica no município de Jataí (GO),

apontam a ocorrência deste mesmo padrão para *Qualea multiflora* Mart, *Qualea grandiflora* Mart e outras espécies típicas do Cerrado, como *Butia purpurascens* Glassman, *Curatella americana* L. e *Piptocarpha rotundifolia* (Less) Baker. Segundo Seitz (1994), essa característica sugere a existência de um banco de plântulas que mostra uma dinâmica natural do ambiente, permitindo o recrutamento de indivíduos ao longo do tempo.

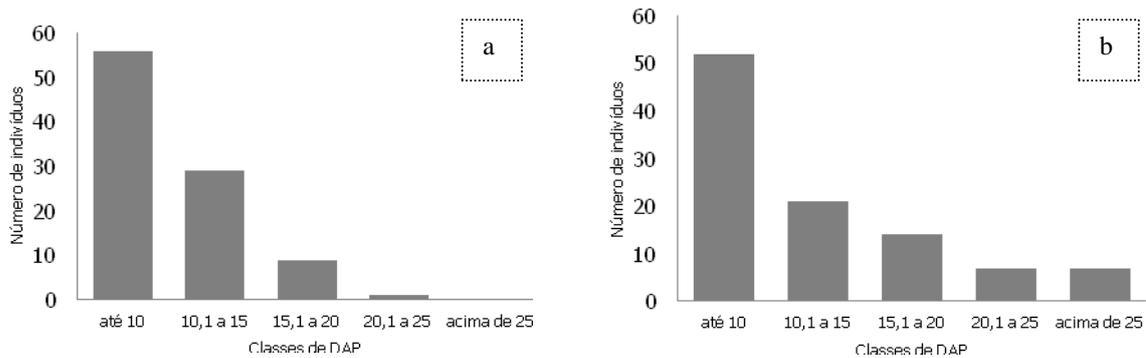


Figura 4.5 - Distribuição diamétrica das populações de *Q. grandiflora* Mart em Brotas (a) e Pedregulho (b). Ano base: 2010

É de suma importância que nas áreas de Brotas e Pedregulho se mantenha um balanço positivo entre recrutamento e mortalidade, pois o fragmento de Brotas é vizinho à área de pastoreio, além de ser uma área com muitas trilhas abertas, exposta à pressão antrópica. Em Pedregulho, embora o fragmento esteja protegido em Unidade de Conservação (Parque Furnas do Bom Jesus), a criação desta é recente (1989) e antes disso a área encontrava-se sob constante pressão antrópica, além de ter passado por um incêndio de grandes proporções há aproximadamente duas décadas. Tratam-se portanto de fragmentos de Cerrado alterados, que não correspondem à vegetação primária e que estão suscetíveis à processos de regeneração.

As populações de Assis e Itirapina (Figura 4.6) apresentaram curvas que variam ao modelo “J-invertido”. Este padrão corresponde em literatura ao que se denomina “seleção natural estabilizadora”, quando um fenótipo intermediário é favorecido. No mesmo estudo de Bernasol e Lima-Ribeiro (2010), há uma irregularidade do padrão “J-invertido” pela variação de valores para as últimas classes de tamanho de *Q. grandiflora* Mart, porém o decréscimo uniforme na frequência das classes posteriores, verificada estatisticamente e o elevado coeficiente de determinação ao ajuste exponencial negativo indicam que a distribuição diamétrica dessa espécie também tende ao equilíbrio quando analisada no geral, embora com sinais de irregularidade.

Este padrão observado nas áreas de estudo pode estar associado à diversas situações, como o fato das populações não se reproduzirem de maneira regular anualmente,

característica comum que foi observada em campo. Também é possível que as condições ambientais não sejam favoráveis para o crescimento da espécie ou que o histórico de antropização também afete as características da espécie, visto que a população de Itirapina localiza-se dentro da Estação Experimental e a de Assis é vizinha de culturas e há presença invasiva da espécie *Braquiária*. Por fim, é preciso considerar que os indivíduos com DAP abaixo de 5 cm não foram incluídos no estudo.

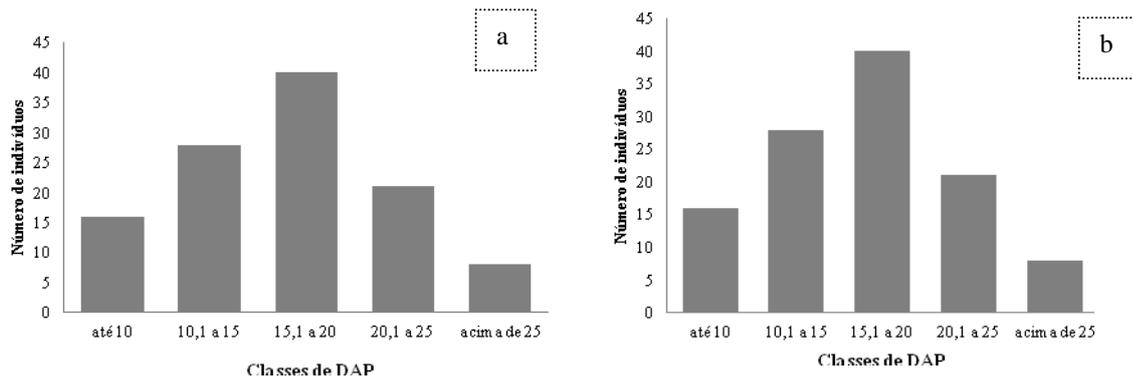


Figura 4.6 - Distribuição diamétrica das populações de *Q. grandiflora* Mart em Assis (a) e Itirapina (b). Ano base: 2010

4.3.2 Diversidade genética

Nas quatro populações estudadas, o número médio de alelos por loco variou de 11 a 14, sendo que o número de alelos efetivos variou de 4,5 a 6,8 (Tabela 4.3). Os alelos efetivos são os que realmente contribuirão para a formação da nova geração e nota-se uma grande redução de seus valores, pois representam menos da metade dos alelos totais.

Com exceção do loco *Qgr1* na população de Brotas e *Pedregulho* e do loco *Qgr11* na população de *Pedregulho*, todos os valores de Heterozigosidade observada (H_o) foram menores que o de Heterozigosidade esperada (H_e), o que indica um excesso de homozigotos nas populações. Salustio et al. (2008) utilizando locos enzimáticos também aponta excesso de homozigotos na população, embora com valores mais baixos para H_o (0,232) e H_e (0,329).

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) médio variou de 0,708 a 0,801. Seus valores podem variar de 0 (para perfis monomórficos) até 1 para perfis altamente polimórficos. Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, enquanto valores entre 0,25 e 0,5 são mediantemente informativos. Abaixo disso, são considerados pouco informativos, que é o caso de perfis monomórficos (valor 0). Sendo assim, todos os locos em todas as populações forneceram elevado conteúdo de informação.

Tabela 4.3 - Índices de diversidade genética obtidos para 8 locos SSR nas populações de *Q. grandiflora* Mart estudadas em Assis, Brotas, Itirapina e Pedregulho

Assis	N	Â	Ae	Ho	He	PIC	f (IC 95%)
Qgr1	91	15	4,1	0,626	0,757	0,735	0,173
Qgr3	90	6	3	0,355	0,662	0,6	0,463
Qgr4	90	17	6,5	0,389	0,846	0,822	0,54
Qgr7	87	16	5,9	0,655	0,83	0,809	0,21
Qgr11	79	16	7,2	0,569	0,861	0,838	0,339
Qgr12	83	14	10,5	0,44	0,905	0,887	0,513
Qgr13	61	9	5,8	0,393	0,828	0,795	0,525
Qgr20	84	17	5,6	0,559	0,822	0,798	0,319
Média	83,1	13,7	6,1	0,498	0,814	0,735	0,387(0,367-0,402)
Brotas	N	Â	Ae	Ho	He	PIC	f (IC 95%)
Qgr1	83	9	3,1	0,734	0,68	0,629	-0,08
Qgr3	85	7	4,3	0,27	0,77	0,725	0,649
Qgr4	85	15	7,6	0,552	0,869	0,848	0,364
Qgr7	78	19	8,2	0,439	0,878	0,859	0,5
Qgr11	68	15	9,3	0,794	0,893	0,875	0,111
Qgr12	48	11	8,4	0,688	0,881	0,856	0,219
Qgr13	66	12	5,6	0,53	0,821	0,787	0,354
Qgr20	78	12	6,4	0,538	0,843	0,817	0,361
Média	73,9	12,5	6,6	0,568	0,829	0,799	0,315(0,256-0,336)
Itirapina	N	Â	Ae	Ho	He	PIC	f (IC 95%)
Qgr1	81	12	2	0,382	0,509	0,489	0,248
Qgr3	75	6	3,2	0,266	0,686	0,624	0,611
Qgr4	80	10	3,2	0,212	0,69	0,631	0,692
Qgr7	77	14	4,5	0,558	0,777	0,754	0,281
Qgr11	55	11	5,4	0,545	0,814	0,781	0,33
Qgr12	77	15	5,7	0,506	0,826	0,799	0,387
Qgr13	62	9	4,5	0,21	0,778	0,734	0,73
Qgr20	80	16	7,7	0,449	0,87	0,849	0,483
Média	73,3	11,6	4,5	0,391	0,743	0,708	0,474(0,447-0,492)
Pedregulho	N	Â	Ae	Ho	He	PIC	f (IC 95%)
Qgr1	97	17	5,6	0,978	0,821	0,802	-0,192
Qgr3	99	8	4	0,081	0,75	0,704	0,892
Qgr4	99	15	3,9	0,454	0,741	0,712	0,387
Qgr7	99	19	10,1	0,595	0,901	0,886	0,339
Qgr11	92	12	7,5	0,924	0,866	0,848	-0,067
Qgr12	87	10	3,9	0,352	0,742	0,705	0,525
Qgr13	82	16	11,4	0,671	0,912	0,897	0,264
Qgr20	91	15	8	0,681	0,875	0,858	0,221
Média	93,2	14	6,8	0,592	0,826	0,801	0,221(0,255-0,336)

N = número de indivíduos amostrados; Â = número alelos; Ae= número efetivo de alelos; Ho= heterozigosidade observada; He= heterozigosidade esperada; PIC = Conteúdo de Informação Polimórfica; f = índice de fixação; (IC 95%) = intervalo de confiança do índice de fixação a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens *bootstrap* sobre locos. Ano base: 2010

Com exceção dos locos Qgr1 em Brotas e Pedregulho e Qgr11 em Pedregulho, todos os valores de índice de fixação foram positivos e significativamente diferentes de zero. Os valores elevados (acima de 0,2) indicam a presença de endogamia nas populações. A média dos locos por população variou de 0,221 em Pedregulho a 0,474 em Itirapina. Estes resultados são similares a outros estudos, tanto para espécies comuns do cerrado (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Carvalho et al., 2010) como para espécies raras (*Hymenaea stigonocarpa* Mart - Defavari et al., 2009). Salustio et al. (2008) apontou um valor de 0,299 para a endogamia numa população de *Qualea grandiflora* Mart em Itirapina.

O teste de adesão ao Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) confirma o desvio em todas as populações. Assis e Itirapina apresentam desvio em 7 locos, Brotas em 6 e Pedregulho em 4 (Tabela 4.4). Os desvios nas proporções de EHW podem ser causados por diversos fatores, como por exemplo, mutação, deriva genética, seleção, migração ou pelo sistema misto de reprodução. O excesso de homozigotos é um indicativo deste desvio, tendo como consequência a endogamia nas quatro áreas de estudo, conforme discutido anteriormente.

Tabela 4.4 - Teste de adesão ao Equilíbrio de Hardy Weinberg para as quatro populações de *Q. grandiflora* Mart estudadas no estado de SP e oito locos SSR, onde $p < 0,5$ é significativo(*) de desvio do equilíbrio. Ano base: 2010

População	Qgr1	Qgr3	Qgr4	Qgr7	Qgr11	Qgr12	Qgr13	Qgr20
Assis	0*	0*	0*	0,64	0*	0*	0*	0*
Brotas	0,66	0*	0*	0*	0,21	0,04*	0*	0*
Itirapina	0*	0*	0*	0,11	0,03*	0*	0*	0,04
Pedregulho	0*	0*	0*	0,05	1	0*	0,67	0,05

Foi constatada a presença de 26 alelos exclusivos nas populações. A população de Pedregulho apresentou o maior número (9) enquanto Assis e Brotas tiveram o menor número (5). Em Itirapina foram identificados 7 alelos exclusivos, conforme Tabela 4.5. Destes alelos, 6 podem ser considerados raros ($p \leq 0,05$), sendo que 4 pertencem à população de Pedregulho e um à população de Assis e outro à Brotas. A presença destes alelos pode ser um indicativo da restrição de fluxo de genes nas áreas, indicando um princípio de diferenciação entre as populações. O reconhecimento destes alelos é fundamental para o uso adequado dos recursos genéticos e para que estratégias eficazes de conservação sejam tomadas a fim de assegurar a manutenção da variabilidade genética da espécie.

Não foi detectada a presença de clones em nenhuma das populações de *Q. grandiflora* Mart estudadas, o que descarta a possibilidade de ocorrência de reprodução vegetativa nestas áreas.

Tabela 4.5 - Frequência de alelos exclusivos por loco nas quatro populações de *Q. grandiflora* Mart estudadas no estado de São Paulo. Ano base: 2010

Loco	Alelo	Assis	Brotas	Itirapina	Pedregulho
Qgr1	156	-	-	-	0,005*
Qgr1	182	-	-	-	0,021
Qgr1	170	-	-	-	0,129
Qgr1	200	-	-	0,018	-
Qgr1	192	0,005*	-	-	-
Qgr3	208	-	0,006	-	-
Qgr4	208	-	-	-	0,010
Qgr4	240	-	-	0,006	-
Qgr4	222	-	0,005*	-	-
Qgr4	206	0,011	-	-	-
Qgr7	266	-	-	-	0,005*
Qgr7	258	-	-	-	0,005*
Qgr7	228	-	-	0,006	-
Qgr7	246	-	0,006	-	-
Qgr7	224	-	0,006	-	-
Qgr11	212	-	0,037	-	-
Qgr11	230	0,006	-	-	-
Qgr11	228	0,013	-	-	-
Qgr12	204	-	-	0,006	-
Qgr12	240	0,012	-	-	-
Qgr13	186	-	-	-	0,018
Qgr13	218	-	-	-	0,018
Qgr20	224	-	-	-	0,005*
Qgr20	260	-	-	0,025	-
Qgr20	216	-	-	0,006	-
Qgr20	212	-	-	0,006	-
Total		5	5	7	9

* = alelos raros

4.3.3 Estrutura genética espacial

Com relação à estrutura genética espacial das populações, na Tabela 4.6 estão listados os índices de fixação de alelos médio (f) e total (F) dentro das populações, além do coeficiente de coancestria (θ), que é a probabilidade de se amostrar, ao acaso, dois alelos idênticos por descendência em dois indivíduos dentro das populações. As estatísticas F também se referem à aderência das populações ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores de F iguais a zero

indicam aderência das populações ao EHW, enquanto valores positivos indicam excesso de homocigotos e valores negativos indicam excesso de heterocigotos (WRIGHT, 1965). Os resultados das estatísticas F foram positivos e significativos para todos os locos, demonstrando que houve desvio de panmixia, com conseqüente estruturação, conforme demonstram os índices de coancestria (θ), também significativamente diferentes de zero. Para Salustio et al. (2008) os altos valores de endogamia em contraste aos baixos valores de heterocigosidade observada, indicam variabilidade restrita da espécie, sugerindo fluxo gênico restrito com predominância de autocruzamentos ou cruzamentos entre indivíduos aparentados, propondo então a hipótese de existência de estruturação familiar.

Tabela 4.6 - Estrutura genética de *Q grandiflora* Mart em 08 locos SSR. Média para quatro populações estudadas no estado de São Paulo

Loco	F	f	θ
Qgr1	0,067	0,058	0,009
Qgr3	0,678	0,028	0,669
Qgr4	0,514	0,059	0,483
Qgr7	0,370	0,053	0,335
Qgr11	0,193	0,045	0,155
Qgr12	0,474	0,072	0,434
Qgr13	0,460	0,031	0,442
Qgr20	0,348	0,010	0,342
Média	0,388	0,044	0,359
(IC)	(0,228-0,547)	(0,027-0,061)	(0,188-0,528)

F= Endogamia total das populações; f= Endogamia das subpopulações (média); θ = Índice de coancestria, medida de divergência entre as populações; IC =Intervalo de confiança a 95% obtido por 10.000 reamostragens *bootstrap* sobre locos. Ano base: 2010

Nas 4 populações estudadas, observa-se a formação de estrutura genética espacial nas primeiras classes de distância. Isso significa que há tendência à estruturação familiar (formação de *pedigree*) nas classes de distância menores, com declínio conforme aumenta-se a distância entre os indivíduos. Ou seja: os agrupamentos de árvores que se encontram separadas a distâncias menores que 30 metros em Brotas, 40 metros em Assis, Itirapina e Pedregulho (Figura 4.7) são constituídos por indivíduos semelhantes geneticamente e provavelmente aparentados, o que corrobora os resultados obtidos para o desvio do Equilíbrio de Hardy Weinberg discutidos anteriormente.

A distribuição espacial da variabilidade genética dentro de uma população pode influenciar significativamente a dinâmica evolutiva da mesma (ENDLER, 1977). A estruturação moderada em faixas curtas de distância pode ser atribuída à dispersão limitada de sementes, à reprodução vegetativa e à seleção variando espacialmente (LOISELLE et al. 1995, SHAPCOTT, 1995).

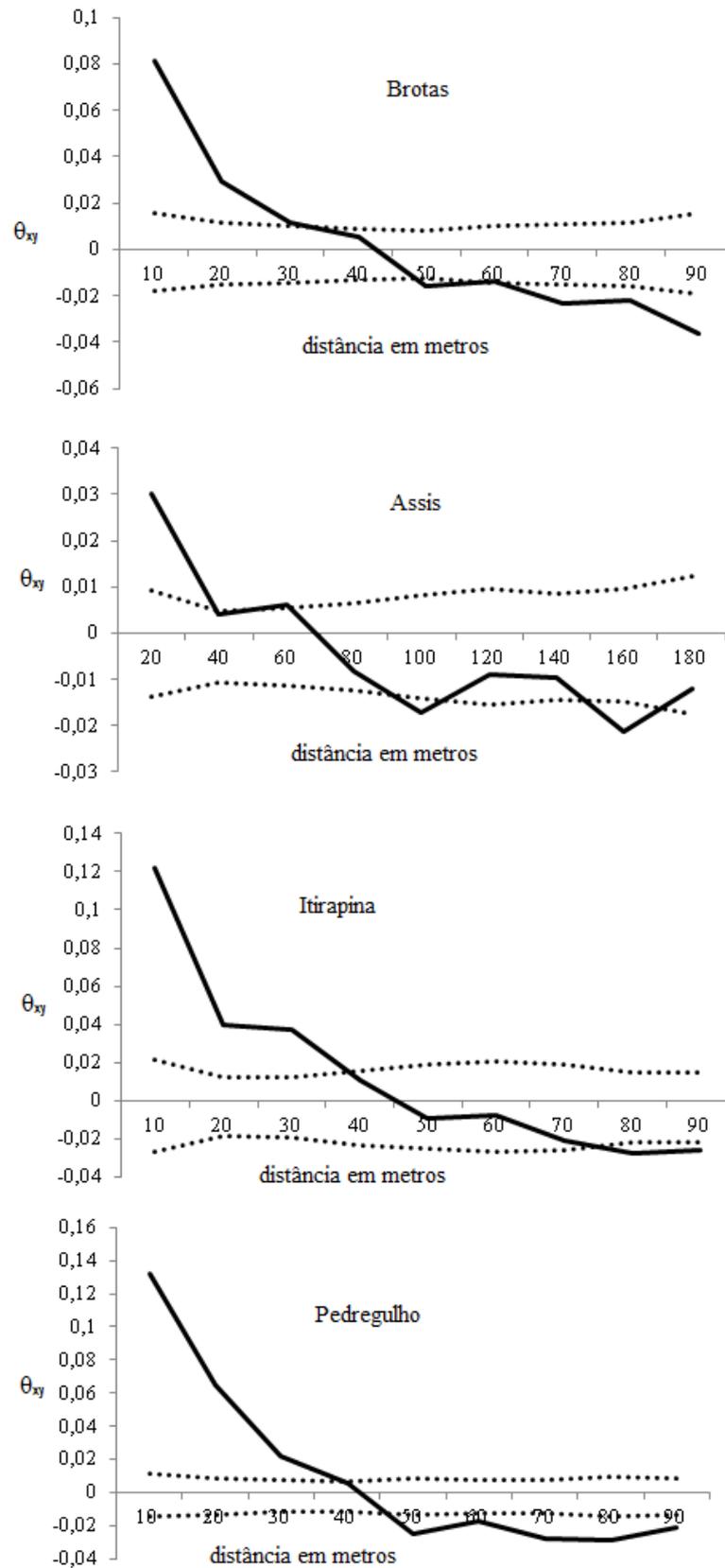


Figura 4.7 - Correlograma do coeficiente de coancestria (θ_{xy}) em nove classes de distâncias entre árvores de *Q. grandiflora* Mart em Brotas, Assis, Itirapina e Pedregulho. Linhas tracejadas indicam o limite inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al. (1995). Ano base: 2010

Segundo Gusson et al. (2006), o reconhecimento da existência de um certo nível de estruturação genética espacial nas populações da espécie auxilia no estabelecimento de medidas de conservação genética, melhoramento genético, recuperação de áreas degradadas, bem como inferir sobre tamanhos mínimos de área para a sua conservação *in situ*.

4.3.4 Correção do índice de fixação para o efeito Wahlund

O índice de fixação foi corrigido para as quatro populações utilizando-se a primeira classe de distância da estrutura genética espacial (Tabela 4.7). A influência do efeito Wahlund foi baixa em três populações, variando de 8,5% na população de Assis a 15,1% em Itirapina e 19% em Brotas. Na população de Pedregulho o resultado foi bastante significativo: aproximadamente 53,3% do valor de f foi devido a este efeito.

O efeito Wahlund acaba por subdividir as populações em unidades reprodutivas diferenciadas e isoladas. Segundo Wright (1951), a subdivisão da população pode elevar a probabilidade de cruzamentos entre aparentados, aumentando a coancestria e a endogamia. Neste estudo, a estrutura genética espacial para as populações foi baixa, porém os índices de endogamia foram elevados, principalmente nas populações de Assis, Brotas e Itirapina.

Tabela 4.7 - Correção do índice de fixação para as quatro populações de *Q. grandiflora* Mart estudadas em SP

População	f	θ_{xy}	F_n
Assis	0,387	0,051	0,354
Brotas	0,315	0,081	0,255
Itirapina	0,474	0,121	0,402
Pedregulho	0,221	0,132	0,103

f = índice de fixação; θ_{xy} = valor mais alto da estrutura genética espacial; F_n = valor corrigido do índice de fixação. Ano base: 2010

Com a finalidade de verificar a ocorrência de divisão das populações estudadas, foi utilizado o software Structure, que definiu o provável número de grupos (K) nas amostras. De maneira geral, a análise revelou que os grupamentos encontrados correspondem às populações de *Qualea grandiflora* Mart amostradas nas quatro localidades do estado de São Paulo, exceto pela similaridade de Assis e Itirapina que foram definidos como um grupo único. Ao total, foram definidos 3 grupos (vermelho, azul e verde) para as quatro populações estudadas (Figura 4.8). Embora Brotas seja a população mais próxima (geograficamente) de Itirapina, percebe-se que este fator não influencia o compartilhamento de seu genoma, pois as duas populações foram consideradas grupos diferentes. Outros estudos abordando esta mesma

metodologia (por ex. FARIAS, 2010) tendem a obter resultados que revelam número de grupamentos respectivos às populações estudadas.

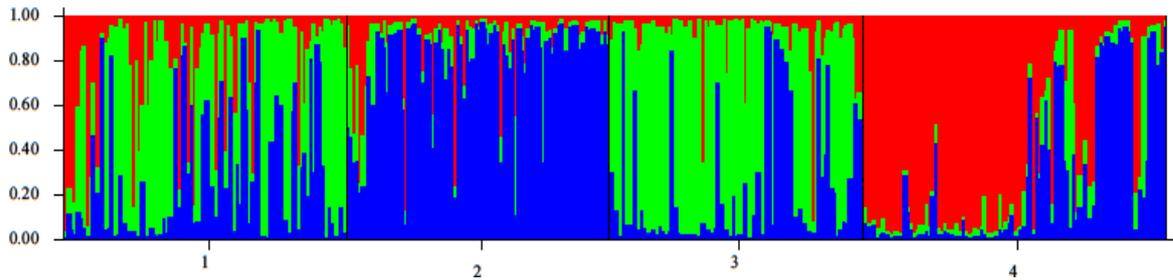


Figura 4.8 - Grupos vermelho, azul e verde (K=3) definidos por semelhanças genotípicas para as quatro populações de *Q. grandiflora* Mart estudadas no estado de SP (1= Assis; 2= Brotas; 3= Itirapina e 4= Pedregulho). Ano base: 2010

Na Figura 4.9 podem ser visualizados todos os indivíduos adultos estudados nas quatro populações, onde nota-se a porcentagem do genoma pertencente a cada grupo. O grupo vermelho está concentrado na primeira metade da população de Pedregulho. O grupo verde é composto pelas populações de Assis e Itirapina. O grupo azul está concentrado na população de Brotas. Nota-se uma grande diferenciação entre a maior parte da população de Pedregulho com relação às outras, formando um grupo isolado com genoma de até 90% diferenciado dos demais indivíduos. Valores acima de 80% já permitem incluir um indivíduo majoritariamente a um grupo. Estes resultados são condizentes com os apresentados para o Efeito Wahlund, onde esta população apresenta-se diferenciada das demais.

Com relação à similaridade genética das populações de Assis e Itirapina, é possível considerar a hipótese de que a semelhança de condições ecológicas como do clima, solo e altitude podem levar à similaridade genética entre indivíduos (GRAUDAL et al., 1997). Um estudo abrangendo estas características em conjunto com as análises genéticas poderia demonstrar a validade de tal proposição.

As análises de fluxo gênico também podem contribuir para explicar este fato, pois sabe-se que o maior movimento dos genes entre as populações pode fazer com que populações distantes se tornem geneticamente similares, consequentemente reduzindo as chances de especiação. Quanto menor o fluxo gênico entre duas populações, maior a probabilidade de que um dia evoluam para duas espécies (FUTUYMA, 1992).

O estudo de outras populações de *Qualea grandiflora* Mart no Parque Estadual Furnas do Bom Jesus, em Pedregulho, também poderia ajudar a elucidar as questões aqui levantadas, verificando se estas populações se assemelham à estudada ou apresentam novos padrões de diversidade genética ainda não conhecidos ou similares às áreas de Assis, Brotas e Itirapina.

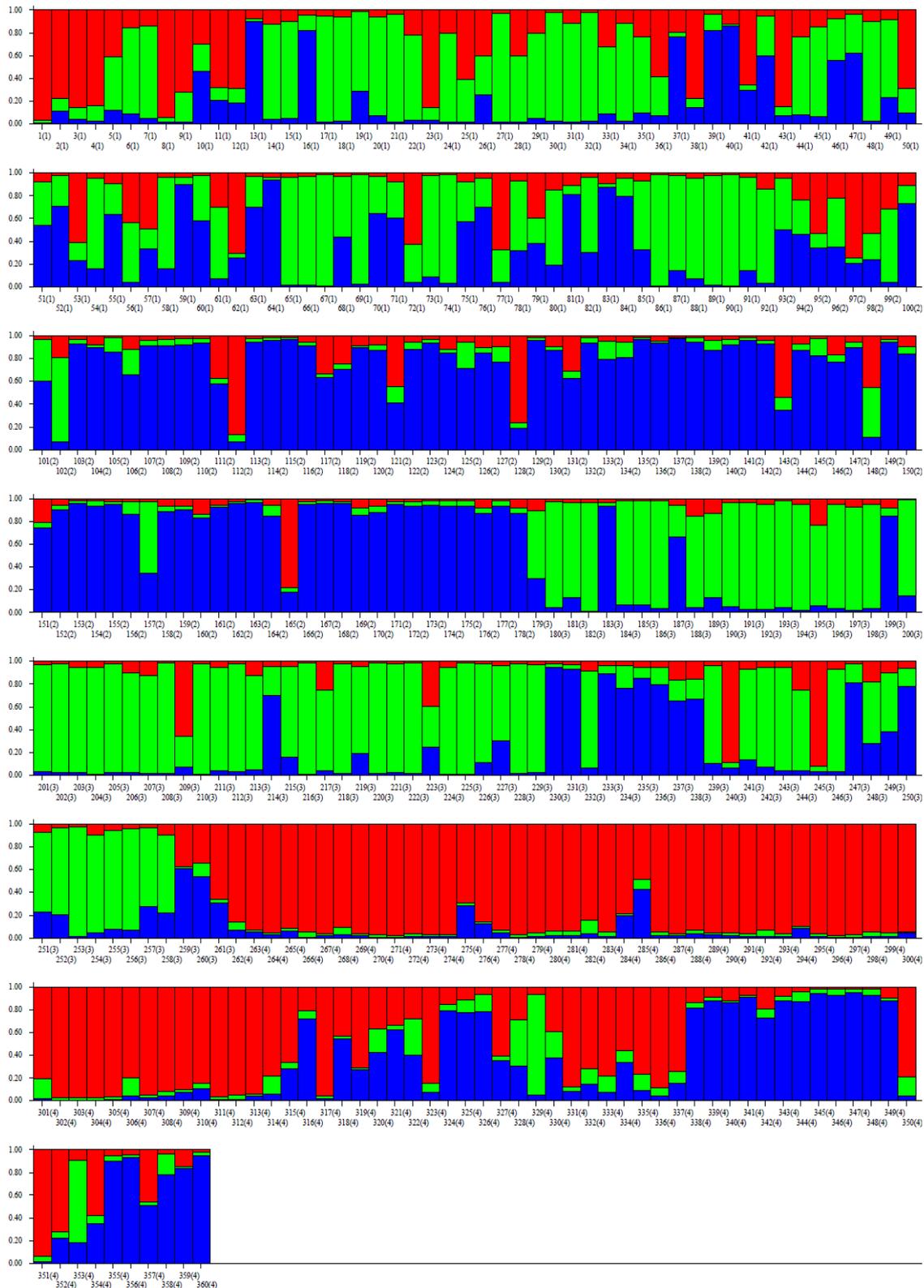


Figura 4.9 - Estrutura genética dos indivíduos adultos de *Q. grandiflora* Mart pertencentes à quatro populações de estudo no estado de SP, sendo que o número do indivíduo é seguido da população a qual pertence: 1= Assis; 2= Brotas; 3= Itirapina e 4= Pedregulho. Ano base: 2010

Como medida de distância genética entre as populações, foi utilizada a distância genética de Nei (1978). Foi construído um dendrograma (Figura 4.10) utilizando-se o método

UPGMA ("Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average"- Agrupamento não-ponderado aos pares utilizando médias aritméticas). Nota-se que as populações de Assis e Itirapina formam um grupo próximo e mais similar a Brotas com relação a Pedregulho, que possui maior distância genética das demais áreas de estudo. Quando há ocorrência de elevada diferença genética entre as populações, todos os procedimentos relacionados à conservação da espécie devem considerá-las separadamente.

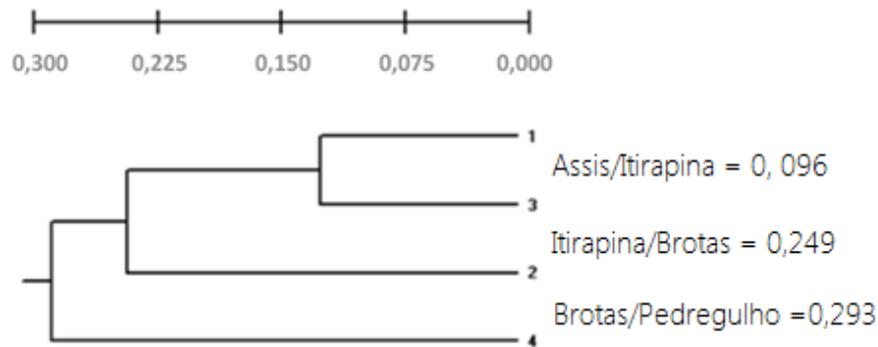


Figura 4.10 - Dendrograma de distâncias genéticas entre as populações de *Q. grandiflora* Mart das quatro áreas de estudo em SP, sendo: 1= Assis; 2= Brotas; 3= Itirapina; 4= Pedregulho. Ano base: 2010

A distância genética (diferenciação) de uma população das demais, a longo prazo pode em alguns casos ser prejudicial, pois indiferente dos mecanismos que levaram à separação da população (barreiras geográficas, climáticas, etc), estas populações podem caminhar, geração após geração, para a deriva genética. Os desvios genéticos da população original podem levar ao desaparecimento de alelos e fixação de outros, completamente por acaso, independente de seu valor adaptativo (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002). A redução da variabilidade pela eliminação de alelos em populações pequenas, pode reduzir a capacidade de adaptação a alterações ambientais, levando ao declínio da espécie, por fixação de alelos menos favoráveis. Estes fatores devem ser considerados em questões de manejo, pois muitas vezes as populações precisam ser tratadas como unidades independentes.

4.3.5 Tamanho efetivo e área mínima viável

Sabe-se que o conceito de tamanho efetivo tem papel importante nas teorias evolutiva (WRIGHT, 1938), genética de populações, genética quantitativa (CABALLERO; HILL, 1992) e conservação genética (SUGG; CHESSER, 1994). O tamanho efetivo teórico pode, contudo, diferir muito do tamanho senso de uma população, sendo, usualmente, muito menor (WRIGHT, 1938). As estimativas de tamanho efetivo populacional (N_e) para *Q. grandiflora* Mart foram todas de menos de 10 indivíduos. Ou seja: os indivíduos amostrados nas

populações representam geneticamente, aproximadamente 9,6 plantas de uma população panmítica ideal (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 - Estimativas da área mínima viável (AMV) para conservação genética *in situ* em de *Q. grandiflora* Mart nas quatro populações estudadas no estado de SP

População	N	$N\hat{e}$	D	AMV ₍₁₀₀₀₎	AMV ₍₅₀₀₎	AMV ₍₅₀₎
Assis	91	9,61	51,4	184,2	92,1	9,2
Brotas	84	9,43	107,8	82,6	41,3	4,1
Itirapina	83	9,61	78,6	110	54,9	5,4
Pedregulho	99	9,80	111	91	45,5	4,5

N = tamanho amostral; $N\hat{e}$ = tamanho efetivo populacional; D = densidade populacional; AMV₍₁₀₀₀₎ = área necessária para conter $N_{e(ref)} = 1000$; AMV₍₅₀₀₎ = área necessária para conter $N_{e(ref)} = 500$; AMV₍₅₀₎ = área necessária para conter $N_{e(ref)} = 50$ Ano base: 2010

A área mínima viável (AMV) para conservação genética *in situ* nos locais estudados com base no tamanho de 50 (curto prazo), foi estimada entre 4,1 a 9,2 hectares. A médio prazo (AMV₅₀₀), variou de 41,3 a 92,1 ha e a longo prazo (AMV₁₀₀₀) variou entre 91 e 184,2 ha. Em Pedregulho são necessárias as menores áreas para conservação enquanto em Itirapina estão as maiores.

A estimativa do tamanho efetivo das amostras analisadas foi baixa. Contudo, as áreas amostradas representam apenas uma fração do total da área de cada fragmento de cerrado. Como *Q. grandiflora* Mart encontra-se em alta densidade em todas as áreas de estudo, possivelmente o número de indivíduos existente em cada local de estudo possa ser suficiente para alcançar um tamanho efetivo de 500. O mesmo raciocínio aplica-se na estimativa de área mínima viável para conservação, pois todas as áreas de estudo estão em fragmentos que apresentam o tamanho suficiente para garantir a conservação *in situ* da espécie tanto à curto, quanto médio e longo prazos, incluindo também o potencial para conservação *ex situ* (coleta de sementes) e recuperação ambiental.

4.3.6 Fluxo gênico aparente

Conforme apresentado anteriormente, a maior parte da divergência genética (96,4%) encontra-se dentro das populações, considerando-se a média do índice de coancestria (0,36 - ver Tabela 4.6). Apresenta-se aqui a divergência genética entre cada par de populações, utilizando-se os três índices mais adequados para esta análise (θ_p , R_{st} e G_{st}) que mostram baixos índices de divergência (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 - Divergência genética e fluxo gênico realizado entre as populações de *Q. grandiflora* Mart estudadas no estado de SP

População	Fluxo	θ_p	R_{st}	G_{st}'
Assis x Brotas	3,47	0,031	0,037	0,163
Assis x Itirapina	4,16	0,026	0,058	0,104
Assis x Pedregulho	2,73	0,039	0,048	0,2
Itirapina x Pedregulho	1,71	0,061	0,065	0,265
Itirapina x Brotas	1,80	0,058	0,096	0,253
Brotas x Pedregulho	2,15	0,049	0,061	0,267

θ_p = índice de divergência genética entre populações; G_{st}' = índice de divergência genética (Hedrick, 2005); R_{st} = índice de diversidade genética (Goodman, 1997). Ano base: 2010

As diferenças nos resultados obtidos para as estimativas de G_{st} , θ_p e R_{st} ocorrem devido ao modelo mutacional utilizado no cálculo. Enquanto θ_p se baseia no modelo de alelos infinitos, R_{st} utiliza o modelo de mutação aos passos. Já o modelo G_{st}' considera além das frequências alélicas no modelo de alelos infinitos, os diferentes tipos de alelos existentes nas populações. No entanto todos os valores foram próximos e baixos, indicando uma baixa divergência genética nas populações e demonstrando novamente que a menor parte da divergência genética encontra-se entre as populações, enquanto o restante encontra-se dentro delas.

Os valores obtidos são similares aos encontrados em outros estudos considerando os mesmos índices para espécies do cerrado: Zimback et al. (2004) relataram que 12,5% da variabilidade genética em populações de *Trichilia pallida* Sw. ocorre entre suas populações. Para *Eugenia dysenterica* DC, Zucchi (2002) observou divergência genética de 27%. Estopa et al. (2006), encontrou para o valor de 21% na variabilidade genética entre populações de *Eremanthus erythropappus* DC. MacLeish.

A menor divergência genética observada é entre as populações de Assis X Itirapina enquanto as maiores são entre Itirapina X Brotas e Brotas X Pedregulho. O fator de distância geográfica não parece estar influenciando nos resultados, visto que as distâncias entre estas populações são similares e a diferenciação genética entre Brotas e Itirapina (que são áreas próximas) está entre os valores mais elevados.

Por fim, os valores de número de migrantes por geração (também chamado de fluxo gênico aparente ou histórico) obtidos no presente estudo, variaram de 1,7 a 4,1. Govindajaru (1989) distinguiu 3 níveis de fluxo gênico: alto (acima de 1), intermediário (entre 0,25 e 0,99) e baixo (abaixo de 0,25). Todos os valores obtidos foram considerados altos, suficientes para

contrapor os efeitos da deriva genética. Importante ressaltar que o maior fluxo realizado é entre as áreas de Assis e Itirapina, consideradas como um mesmo grupo (genoma similar) e com a menor distância genética entre si.

Melo-Junior et al. (2004) estudando *Caryocar brasiliense* Camb, estimou valores de fluxo gênico variando de 1,9 a 15,5 em populações distantes entre si de 35 a 100 km. Relacionou este resultado à baixa divergência genética encontrada entre elas (2%) e à distância geográfica (maiores índices de fluxo em áreas mais próximas). No entanto, esta possibilidade não é válida para o estudo aqui apresentado, visto que as áreas mais próximas entre si (Brotas e Itirapina) apresentaram um dos menores resultados (1,8), enquanto áreas bastante distantes entre si (Assis e Itirapina, 360 km) apresentaram o maior valor (4,1).

É importante ressaltar que sendo a estimativa de fluxo gênico calculada através do índice R_{st} (θ_p), o fluxo não deve ser considerado contemporâneo, mas baseado na história genética destas populações.

4.3.7 Gargalos genéticos

Os testes de Wilcoxon de adequação ao Modelo de Passos de Mutação (KIMURA; OHTA, 1975) indicaram as ocorrências de expansões populacionais recentes - até 12 gerações, segundo Van Rossum e Prentice (2004), nas 4 populações analisadas. Os testes de Wilcoxon de adequação ao modelo de mutação de alelos infinitos (CORNUET; LUIKART, 1996; LUIKART; CORNUET, 1998; PIRY et al., 1999), indicaram a ocorrência de gargalo populacional recente no fragmento de Brotas (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 - Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Q. grandiflora* Mart nas quatro áreas de estudo em SP, sob o modelo de Passos de Mutação e de Alelos Infinitos

População	Modelo de Passos de Mutação			Alelos Infinitos		
	D	E	P (Wilcoxon)	D	E	P (Wilcoxon)
Assis	6	2	0,0195	4	4	1,0000
Brotas	7	1	0,0117	2	6	0,0195
Itirapina	7	1	0,0117	3	5	0,8437
Pedregulho	7	1	0,0078	2	6	0,4069

D= Locus em déficit de heterozigiosidade. E= Locus em excesso de heterozigiosidade. P (Wilcoxon) = Probabilidade a 95% de ocorrência de “bottleneck” para cada população. Ano base: 2010

Nesses fragmentos, a população exibe um número significativo de locos com déficit de heterozigiosidade, a heterozigiosidade esperada (H_e) pelas proporções de EHW é menor do que a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva (H_{eq}). Um modelo de equilíbrio neutro prevê um mesmo número de locos com excesso e deficiência de

heterozigosidade em uma população em que o tamanho efetivo tem permanecido constante (LUIKART; CORNUET, 1998).

A identificação de populações submetidas a gargalos recentes é importante porque as mesmas podem não ter tido o tempo necessário para se adaptarem aos problemas frequentemente causados pelo tamanho populacional reduzido e conseqüentemente podem ter um elevado risco de extinção (LEE et al. 2002). Quanto antes se detectar um gargalo, maior a probabilidade de que efeitos deletérios do mesmo possam ser evitados ou minimizados através de procedimentos mitigadores e de manejo, tais quais o enriquecimento de habitat ou introdução de imigrantes (LUIKART et al. 1998).

4.4 Considerações Finais

O tamanho efetivo da amostra encontra-se abaixo de 10 indivíduos, indicando uma baixa representatividade das mesmas. Foi detectada uma baixa ocorrência de alelos efetivos nas quatro populações bem como elevada presença de homozigotos, devido à ocorrência de endogamia. Estas populações estão desviando-se do Equilíbrio de Hardy Weinberg e apresentando estruturação nas primeiras classes de distância. Estes resultados podem inferir nos procedimentos de coletas de sementes em programas de conservação, que não devem ser realizadas em distâncias menores que 40 metros.

A influência do efeito Wahlund foi de 8,5% até 53,3% nas populações, o que pode levar a subdividir as mesmas em unidades reprodutivas isoladas, aumentando o cruzamento de aparentados e, conseqüentemente, os valores de endogamia. No entanto, é importante ressaltar que as áreas de Assis e Itirapina apresentam elevado fluxo gênico entre si, conseqüentemente a menor divergência genética e maior similaridade do genoma, o que permitiu serem consideradas como um grupo único nas análises de grupos de genótipos. Este fato pode ter relação com a polinização da espécie, realizada por mariposas do tipo Sphingidae, que alcançam longas distâncias.

A diferença entre as outras populações (Brotas e Pedregulho) pode ocorrer por diversos fatores, incluindo barreiras de fluxo gênico e antropismo, pois a alteração dos fragmentos pode elevar a estruturação de populações tornando-as cada vez mais diferentes geneticamente.

Foi constatada a presença de gargalos populacionais recentes em todas as populações, ou seja, é necessário utilizar de procedimentos específicos para o manejo e a conservação da espécie nestas áreas.

Os resultados demonstram que a espécie possui potencial para conservação genética *in situ* e que as áreas estudadas devem ser tratadas como Unidades Significativas Evolutivas (USE) e como Unidades Independentes para o Manejo (UIM).

Referências

BARBOUR, M.G.; BURK, J.H.; PITTS, W.D. **Terrestrial Plant Ecology**. 2 ed. Benjamin Cummings, Menlo-Park: 1987. 634 p.

BERNASOL, W.P.; LIMA RIBEIRO, M de S. Estrutura espacial e diamétrica de espécies arbóreas e seus condicionantes em um fragmento de cerrado sentido restrito no sudoeste goiano. **Hoehnea**, São Paulo, v. 37, n.2, p.181-198, 2010.

BITTENCOURT, J.V.M; SEBBENN, A.M. Pollen movement and spatial genetic structure in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and twogener analysis. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 9, p. 855-868, 2007.

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

CABALLERO, A.; HILL, W.G. A note on the inbreeding effective population size. **Evolution**, Lawrence, v. 46, n. 6, p. 1969-1972, 1992.

CARVALHO, A. C. M. de et al. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.33, n.4, pp. 599-606, 2010.

CHAKRABORTY, R.; JIN, L. Heterozygote deficiency, population substructure and their implications in DNA fingerprinting. **Human Genetics**, Heildelberg, n.88, p.267-272, 1992.

CLARK, D.A. Plant demography. In: McDADE, L.A.; BAWA, K.S.; HESPENHEIDE, H.A.; HARTSHORN, G.S. (Eds.). **La Selva** – ecology and natural history of a neotropical rain forest. Chicago: The University of Chicago Press, 1994. p.90-105.

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

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lawrence, v.23, n.1, p.72-74, 1969.

CONDIT, R.; ASHTON, P.S.; BAKER, P.; BUNYAVEJCHEWIN, S.; GUNATILLEKE, S.; GUNATILLEKE, N.; HUBBELL, S.P.; FOSTER, R.B.; ITOH, A.; LEFRANKIE, J.V.; LEE, H.S.; LOSOS, E.; MANOKARAN, N.; SUKUMAR, R.; YAMAKURA, T. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. **Science**, Washington, v.288, n.5470, p.1414-1418, 2000.

CONSERVATION INTERNATIONAL. **Hotspots Revisitados** - As Regiões Biologicamente Mais Ricas e Ameaçadas do Planeta. 2005. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/publicacoes/files/HotspotsRevisitados.pdf>> Acesso em: 03 mar. 2011.

CORNUET, J.M; LUKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Rockville, v.144, p. 2001-2014, 1997.

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

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

DEGEN, B. **SGS**: spatial genetic software: computer program and user's manual. 2000. Disponível em: < <http://software.bfh-inst2.de/download3.html>>. Acesso em: 17 nov. 2011.

DEGEN, B.; CARON, H.; BANDO, E.; MAGGIA, L.; CHEVALLIER, M.H.L.; LEVEAU, A.; KREMER, A. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. **Heredity**, Cary, v.87, p.497-507, 2001a.

DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS: spatial genetic software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. **Journal of Heredity**, Cary, v.92, p.447-448, 2001b.

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

DURIGAN G. et al. Caracterização de dois estratos da vegetação em uma área de cerrado no município de Brotas, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.16, n.3, p. 251-262, 2002.

ENDLER, J. A. **Geographic variation, speciation, and clines**. New Jersey: Princeton University Press, 1977. 262 p.

ESTOPA, R.A.; DE SOUZA, A.M.de; MOURA, M.C. de O.; BOTREL, M.C.G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. de. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* DC. MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.70, p. 97-106, 2006.

EVANNO, G.; REGNAULT, S.; GOUDET, J., Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14 , p.2611 – 2620, 2005.

- FARIAS, G.S. **Estrutura genética de populações e filogeografia da acariquara (*Minquartia guianensis* Aubl., Olacaceae)**. 2010. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). – Instituto de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.
- FELFILI, J.M.; SOUSA SILVA, J.C.; SCARIOT, A. Biodiversidade, Ecologia e Conservação do Cerrado: avanços no conhecimento. In: SCARIOT, A.; SOUSA SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org.) **Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p.25-44.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 220 p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D. e BRISCOE,, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 617 p.
- FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- GOODMAN, S.J. RstCalc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, Oxford, n.6, p. 881-885, 1997.
- GOUDET, J. **FSTAT**, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). 2001. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 17 nov. 2011.
- GOVINDAJARU, R. D. Variation in gene flow levels among predominantly selfpollinated plants. **Journal of Evolutionary Biology**, Malden, v.2, p.173-181, 1989.
- GRAUDAL, L.; KJAER, E.; THOMSEN, A.; LARSEN, A. B. Planning national programmes for conservation of forest genetic resources. **Technical Notes**, Danida, n. 48, p. 1-58, 1997.
- HAMRICK, J.L. (Ed.) **Conservation genetics: case studies from nature**. New York: Chapman e Hall, 1996. p.471-501.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. **SPAGeDI 1.1**: a program for spatial pattern analysis of genetic diversity. 2003. Disponível em: <<http://ebe.ulb.ac.be/ebe/Software.html>>. Acesso em: 26 out. 2011.
- HARPER, J. L. **Population biology of plants**. London: Academic Press, 1977. 892 p.
- HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, Lancaster, v. 59, n. 8, p. 1633-1638, 2005.

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

KIMURA, M.; CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, Rockville, n. 49, p.725-738, 1964.

KIMURA, M., OHTA, T. Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, v.72, n.7, p. 2761-2764, 1975.

LEDIG, F. T. Heterozygosity, heterosis, and fitness in outcrossing plants. In: SOULÉ, M.E. (Ed.) **Conservation biology: the science of scarcity and diversity**. Sinauer: Sunderland, 1986. p.77-104.

LEE, S.L., NG, K.K.S., SAW, L.G., NORWATI, A., SALWANA, M.H.S., LEE, C. T.; NORWATI, M. Population genetics of *Intsia paclmbanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, Saint Louis, n. 89, p.447-459, 2002.

LOISELLE, B. A. et al. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal Botany**, Saint Louis, v. 82, p. 1420-1425, 1995.

LUIKART, G., ALLENDORF, F.W., CORNUET, J.-M.; SHERWIN, W.B. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, Oxford, n. 89, p.238-247, 1998.

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

LYNCH, M. A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In: AVISE, J.C.; HAMICK, J.L. (Eds.) **Conservation genetics: case studies from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. p.471-501.

MANEL, S., SCHWARTZ, MK., LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v.18, p.189-197, 2003.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação in situ. **IPEF**, Piracicaba, v.35, p.71-78, 1987.

MELO JUNIOR, A.F.de; CARVALHO, D. de ; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.66, p.56-65, 2004.

MILLER, M.P. **TFGA**: Tools for populations genetics analyses. v 1.3. A Window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, 1997. Disponível em: <<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em: 10 out. 2011.

MITTERMEIER, R.A., GIL, R.P., HOFFMAN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C.G., LAMOREUX, J.; FONSECA, G.A.B. **Hotspots revisited**: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions, 2nd. ed. Boston, University of Chicago Press, 2005. 391 p.

MITTON, J.B. Conifers. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J., (Ed). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.443-472.

MORAES, P. L. R. de ; DERBYSHIRE, M. T. V. de C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 3, n.1, 2003.

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Rockville, v.89, p.583-590, 1978.

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

OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetics Resources**, Cambridge, n. 22, p.201-204, 1973.

PINHEIRO, E.S.; DURIGAN, G. Dinâmica espaço-temporal (1962-2006) das fitofisionomias em unidade de conservação do Cerrado no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** v.32, p.441-454, 2009.

PIRY, S., LUIKART, G., CORNUET, J.M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Cary, v.90, p.502-503, 1999.

PRITCHARD, J., STEPHENS, M., DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, Rockville, v.155, p. 945-959 , 2000.

RIBEIRO, J.F.; WALTER B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. e ALMEIDA, S.P. (Ed). **Cerrado**: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA, 1998. p.87-166.

RITTER, L.M.O.; BAJAY, M.; MONTEIRO, M.; SOUZA, R.G.V.C.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae), a typical species of Brazilian Cerrado. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.99, n.3, p.97-98, 2012.

ROSENBERG, N.A., PRITCHARD J.K., WEBER J.L., CANN, H.M., KIDD K.K., ZHIVOTOVSKY, L.A. Structure of Human Populations. **Science**, Washington, v.20, p. 2381-2385, 2002.

SEITZ, R.A. A regeneração natural na recuperação de áreas degradadas. In: SIMPÓSIO SULAMERICANO DE ÁREAS DEGRADADAS. Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1994. p.103-110.

SALUSTIO, P.; TARAZI, R.; MORO, G.; DEFAVARI, G.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética interna em uma população de pau terra na Estação Ecológica de Itirapina, SP. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO 9; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS 2; Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2008. Disponível em: <http://simposio.cpac.embrapa.br/simposio/trabalhos_pdf/00423_trab1_ap.pdf> Acesso em: 10 mar. 2012.

SHAPCOTT, A. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, Cary, v.74, p. 28-38, 1995.

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

SUGG, D.W.; CHESSER, R.K. Effective population size with multiple paternity. **Genetics**, Rockville, v. 137, p.1147-1155, 1994.

VAN ROSSUM, F.; PRENTICE, H. C. Structure of allozyme variation in Nordic *Silene nutans* (Caryophyllaceae): population size, geographical position and immigration history. **Biological Journal of the Linnean Society**, Oxford, v.81, n.3, p.357-371, 2004.

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

WRIGHT, S. Size of population and breeding structure in relation to evolution. **Science**, Washington, v. 87, n. 2263, p. 430-2264, 1938.

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

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

ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A.; MELLO JÚNIOR, J.R.S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.65, p.114-119, 2004.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

Resumo

Este trabalho teve por objetivo investigar o sistema reprodutivo e o padrão de dispersão de pólen em progênies de *Qualea grandiflora* Mart, visando contribuir com o conhecimento da espécie, ainda pouco estudada do ponto de vista genético. O estudo foi realizado numa Unidade de Conservação (Floresta Estadual de Assis, SP), numa área de 2,2 hectares, próxima à represa do Horto Florestal. Para a realização das análises, foram utilizadas 300 sementes, provenientes de 25 matrizes (12 sementes de cada matriz), contando com uso de marcadores microssatélites (SSR) específicos, previamente desenvolvidos para a espécie. Os resultados da taxa de cruzamento indicam que a espécie se reproduz por cruzamentos entre indivíduos parentes e não aparentados (0,913). A taxa uniloco foi de 0,632, indicando que há mais cruzamentos entre não parentes do que parentes. A taxa de autofecundação foi baixa (0,087) indicando que a espécie é alógama, com pouca pré disposição para autofecundação. Aproximadamente 35% das plantas dentro de progênies eram parentes no grau de irmãos-completos e aproximadamente 57% eram meios-irmãos. Além disso, aproximadamente 8% das progênies eram irmãos de autofecundação. O coeficiente de coancestria estimado nas progênies foi de 0,139 enquanto o índice de fixação foi de aproximadamente 27%. A estimativa do tamanho efetivo indicou que a representatividade genética da descendência é inferior à esperada em progênies de cruzamentos aleatórios: as amostras analisadas correspondem a apenas 13,2 indivíduos de uma população panmítica ideal.

Palavras-chave: Fluxo gênico; Sistema reprodutivo; *Qualea grandiflora* Mart

Abstract

This study aimed to investigate the reproductive system and the pollen dispersal pattern of progenies of *Qualea grandiflora* Mart in order to increase the knowledge of a species little studied from the genetic point of view. The study was conducted in a conservation area (Floresta Estadual de Assis, SP) of 2.2 hectares near the dam of the Horto Florestal. We used in the analyses 300 seeds from 25 matrix (12 seeds from each matrix) applying specific microsatellite markers (SSR) previously developed for the considered species. The results of the outcrossing rate indicate that the species reproduces by crosses between relatives and unrelated individuals (0.913). The single locus rate was 0.632, showing that there are more crosses between unrelated than related individuals. The self-fertilization rate was low (0.087), therefore indicating that the species is allogamous, with little predisposition for self-fertilization. Approximately 35% of the plants within progenies were full-sibs and approximately 57% were half-sibs. In addition, approximately 8% of progenies were self-fertilized brothers. The estimated coefficient of coancestry in progenies was 0.139, while the rate of fixation was about 27%. The estimated effective size indicated that the genetic representativeness of the offspring is lower than the expected in random cross progenies: the samples analyzed account for only 13.2 individuals in a ideal panmitic population.

Keywords: Gene flow; Reproductive system; *Qualea grandiflora* Mart

5.1 Introdução

A expansão das fronteiras agrícolas para a região centro-oeste do Brasil, vem ameaçando o Cerrado, resultando em fragmentação da vegetação nativa, que está se resumindo a pequenos fragmentos, cercados de monoculturas.

A fragmentação pode causar danos graves para as populações vegetais. Além das consequências demográficas, há consequências genéticas como o aumento da endogamia e a diminuição do fluxo gênico, que pode levar a modificações nos padrões reprodutivos das espécies.

Os estudos de sistema reprodutivo de populações naturais de espécies do Cerrado vem ganhando espaço no meio acadêmico, pois são fundamentais para se compreender a dinâmica de dispersão de pólen e sementes (GOMES; MOURA, 2010). Servem como subsídio para os programas de conservação, que, segundo Barret e Kohn (1991), precisam ser bem elaborados, visto que manter os níveis de variação genética das espécies nativas é considerado um grande desafio.

Este trabalho teve por objetivo investigar o sistema reprodutivo e o padrão de dispersão de pólen em progênies de *Qualea grandiflora* Mart com o auxílio de marcadores microssatélites, visando contribuir com o conhecimento da espécie, ainda pouco estudada do ponto de vista genético.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Área de estudo e amostragem

A área de coleta possui aproximadamente 2,2 hectares e está localizada próximo à represa do Horto Florestal da Floresta Estadual de Assis, SP (coordenadas 22°36'00''S e 50°24'28''O). Sua fisionomia é de Cerrado típico (RIBEIRO; WALTER, 1998), com presença de Braquiária e cobertura arbórea média de 46,3% (PINHEIRO; DURIGAN, 2009).

As árvores foram mapeadas por meio de aparelho receptor GPSmap76 CSx (Garmin), configurado no DATUM South American Brazil (SAD 69) e foram marcadas com plaquetas metálicas identificadas por números. Os dados de georreferenciamento foram tratados utilizando-se os softwares MapSource 6.13.7 (Garmin Ltd) e GPS Trackmaker (Geo Studio Technology).

Foram escolhidas 25 matrizes de *Qualea grandiflora* Mart, considerando-se como critério a maior quantidade de frutos disponíveis nas árvores e maior distância possível umas das outras (Figura 5.1). De cada árvore foram coletados 06 frutos e de cada fruto foram extraídas duas sementes, totalizando 12 sementes por matriz e 300 amostras no total.

Os frutos foram coletados com auxílio de podão e acondicionado em sacos plásticos do tipo “bolha”. O transporte foi feito em caixas de isopor, protegidas por camadas de jornal. Em laboratório as amostras foram armazenadas em geladeira.



Figura 5.1 - Área de estudo no Horto Florestal em Assis, SP. Em azul os indivíduos adultos de *Q. grandiflora* identificados no local e em vermelho as matrizes escolhidas para o estudo de progênies

5.2.2 Extração de DNA e análises genéticas

O DNA das sementes foi extraído segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1990) adaptado (Anexo A), utilizando-se tampão CTAB em concentração de 3% (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Com auxílio de nitrogênio líquido, foi macerada uma semente inteira em cada tubo (*ependorffs*) de 2,0 mL, utilizando-se 900 μ L de tampão em cada amostra.

Na etapa de amplificação dos locos microssatélites, foi utilizado um coquetel (13 μ L) para a realização da PCR composto por 7,5 ng de DNA genômico, 250 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de MgCl₂, tampão para PCR 1X (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, pH 8,3), 2,5 μ g / ml de BSA, 0,2 μ M de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria®). As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100, utilizando-se o seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 29 ciclos de 94°C por 1 minuto,

temperatura de hibridação específica de cada par de iniciadores por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram segregados em gel desnaturante de poliacrilamida a 5%, em eletroforese de uma hora e trinta minutos em tampão TBE 1X em cuba vertical. Os fragmentos foram observados na forma de bandas, após coloração com nitrato de prata. O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10 pb “ladder” - Invitrogen®). Os fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

Foram utilizados 08 locos microssatélites projetados por Ritter et al. (2012) para *Qualea grandiflora* Mart (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Sequências Forward e Reverse utilizadas nos estudos de *Q. grandiflora* Mart com suas respectivas temperaturas de anelamento em graus Celsius e o número de registro no GeneBank

Primer	FORWARD	REVERSE	T (°C)	GeneBank
Qgr1	CACTGGCGATTCATTTCTCA	AGCCCAACCGAGTAAACAAG	58	JN230425
Qgr3	GCGACGATGAGTTTCATTAGC	ATGATTGAGAATGGGGGACT	58	JN230426
Qgr4	GATACAATGTCGGGGAGGAC	CCACGTAAAACCTCAATTCATCG	56	JN230427
Qgr7	ATCAGAGCACTCAAGCAACG	CAGCAAACCTAATGGAGGAGGA	58	JN230428
Qgr11	CGCAAAATCCCCATCTTATC	TGCTCCTTGAGTGCTGTGA	58	JN230429
Qgr12	GGGCTTTATGTCTTTTGGTTTG	CTTCTTCTTCTTCCTCGCAGA	58	JN230430
Qgr13	TGAATGTGTTCCAAACCAGTG	AAGTGTGCGTGTCGTGT	54	JN230431
Qgr20	CATGCGTAAGCGTAAAATCTC	TACATTGCCACGGGAGTAAG	58	JN230432

5.2.3 Análise de dados

O sistema de reprodução das populações foi analisado com base no modelo de cruzamento misto de Ritland e Jain (1981), que pressupõe que: i) os alelos de diferentes locos segregam independentemente; ii) o conjunto de pólen é homogêneo para o cruzamento com qualquer genótipo da população, e iii) ausência de seleção entre o período da fertilização e a avaliação dos marcadores genéticos.

Os dados foram obtidos através do programa Multilocos MLTR (RITLAND, 1997), que permite obter a taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m) e a taxa de cruzamento unilocos (\hat{t}_s) para a população, bem como as frequências alélicas do óvulo e do pólen, pelo método de máxima verossimilhança, utilizando o algoritmo EM (Expectation Maximization).

O algoritmo EM (DEMPSTER; LAIRD; RUBIN 1977; McLACHLAN; KRISHNAN, 1997) é uma poderosa ferramenta computacional para maximizar a estimativa da verossimilhança com dados incompletos (falta de dados, elementos desconhecidos, variáveis

latentes, tipos de censura de observações, e assim por diante). Uma boa introdução deste algoritmo é apresentada por Flury e Zopper (2000).

Para estimar o erro padrão das estimativas dos parâmetros, o programa utiliza o método *Bootstrap*, onde a unidade de amostragem para as estimativas das taxas de cruzamento individual e populacional foram as plantas dentro das progênies e as progênies, respectivamente.

O *Bootstrap* é um procedimento de simulação estatística para atribuir medidas de precisão a estimativas de parâmetros estatísticos. Este método responde problemas estatísticos reais sem o uso de fórmulas complexas. Esta técnica foi introduzida por Efron (1979), como abordagem ao cálculo do erro padrão e de intervalos de confiança de parâmetros, no caso em que o número de amostras é reduzido. Uma leitura mais completa sobre o assunto pode ser vista em Efron e Tibshirani (1993).

Além disso, foi estimada a taxa de cruzamento entre aparentados ($\hat{t}_p = \hat{t}_m - \hat{t}_s$), a correlação multilocos ($\hat{r}_{p(m)}$) e unilocos ($\hat{r}_{p(s)}$) de paternidade, donde derivam a proporção de irmãos completos entre indivíduos de cruzamentos dentro das progênies (\hat{r}_p) e meios-irmãos ($1 - \hat{r}_p$).

Os índices de fixação para adultos (F) e progênies (Fp) e o coeficiente médio de coancestria dentro de progênies (θ_p) foram obtidos pela análise das frequências gênicas da população, através do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002), utilizando um intervalo de confiança a 95% a partir do erro padrão com o método Jackknife sobre locos. O tamanho efetivo populacional (N_e) de adultos e progênies foi obtido através do método de Hill (1981) modificado por Waples (2006).

5.3 Resultados e Discussão

As frequências dos alelos nos óvulos e pólen nos 8 locos estudados (Tabela 5.2) foram iguais, indicando que não houve violação do modelo de acasalamento misto proposto por Ritland e Jain (1981), necessário para a correta estimação da taxa de cruzamento multilocos.

Multiplicando-se a taxa de cruzamento multiloco pela correlação de paternidade determinou-se que aproximadamente 35% das plantas dentro de progênies eram parentes no grau de irmãos-completos e aproximadamente 57% eram meios-irmãos. Além disso, aproximadamente 8% das progênies eram irmãos de autofecundação. Durante muito tempo acreditou-se que a polinização em populações naturais fosse gerada pela contribuição de um grande número de árvores polinizadoras e que os cruzamentos obtidos eram

predominantemente aleatórios. No entanto, os resultados obtidos para *Qualea grandiflora* Mart demonstram que parte das progênies são irmãos completos. Portanto, assumir progênies exclusivamente de meios-irmãos para essa população poderá gerar erros nas estimativas de parâmetros genéticos.

A estimativa da autocorrelação de autofecundação (r_s) ou a probabilidade de encontrar um indivíduo gerado por autofecundação onde foi encontrar outro indivíduos de autofecundações foi de aproximadamente 23%, mas significativa. Isso sugere que existe variação na taxa de cruzamento entre plantas individuais e que há cruzamentos biparentais (mesmas árvores materna e paterna envolvidas em sucessivos cruzamentos).

Segundo Allard (1971), o cruzamento entre aparentados pode gerar endogamia biparental, apesar desse tipo de endogamia ser menos drástico que a autofecundação efetiva.

A correlação de paternidade permite medir a proporção de indivíduos de cruzamentos que foram gerados por cruzamentos biparentais (parentes no grau de irmãos completos). O resultado foi alto (0,379) e significativamente diferente de zero. De acordo com Giudice Neto, Sebbenn e Kageyama (2005), os cruzamentos biparentais podem ser um fenômeno comum em diversas espécies. Estudos com *Caryocar brasiliense* Camb (Collevatti *et al.* 2001) estimaram a correlação de paternidade entre 0,212 e 0,324. Em uma população natural de *Chorisia speciosa* A. St. Hill (Souza *et al.* 2003) foi detectada correlação de 0,875.

Assim, a pressuposição de que espécies arbóreas reproduzem-se por cruzamentos aleatórios, aparentemente, nem sempre é verdadeira, e sua adoção pode incorporar grandes erros nas estimativas de parâmetros genéticos, no estudo da herança de caracteres quantitativos em programas de melhoramento e na determinação de tamanhos amostrais para fins de melhoramento e conservação genética e coleta de sementes para reflorestamentos ambientais (GIUDICE NETO; SEBBENN; KAGEYAMA, 2005).

A partir da correlação de paternidade é possível estimar o número médio de indivíduos que efetivamente polinizaram as árvores maternas, ou seja, a média do número provável de indivíduos que contribuíram com pólen no evento de reprodução de uma árvore mãe. O resultado obtido foi baixo (2,6). Isto indica que apesar da alta densidade de árvores, a dispersão de pólen é restrita na população. Em consequência, o tamanho efetivo retido em amostras de sementes deve ser baixo, comparado a uma população perfeitamente panmítica (GIUDICE NETO; SEBBENN; KAGEYAMA, 2005).

Tabela 5.2 - Frequência dos alelos no pólen e no óvulos, em oito locos estudados em progênies de *Q. grandiflora* Mart

Qgr1				Qgr3				Qgr4				Qgr7			
A	P	O	()	A	P	O	()	A	P	O	()	A	P	O	()
7	0.628	0.628	0.053	3	0.626	0.626	0.074	18	0.251	0.251	0.071	12	0.386	0.386	0.066
8	0.025	0.025	0.010	5	0.035	0.035	0.013	19	0.120	0.120	0.046	2	0.037	0.037	0.016
3	0.047	0.047	0.014	4	0.290	0.290	0.074	20	0.107	0.107	0.031	5	0.189	0.189	0.061
15	0.068	0.068	0.019	6	0.035	0.035	0.014	13	0.259	0.259	0.067	6	0.016	0.016	0.009
14	0.047	0.047	0.018	2	0.006	0.006	0.004	17	0.033	0.033	0.025	8	0.079	0.079	0.030
13	0.051	0.051	0.026	1	0.008	0.008	0.008	11	0.011	0.011	0.008	13	0.014	0.014	0.009
5	0.008	0.008	0.005					6	0.017	0.017	0.010	18	0.069	0.069	0.035
10	0.064	0.064	0.023					16	0.008	0.008	0.006	9	0.079	0.079	0.038
6	0.007	0.007	0.005					14	0.004	0.004	0.004	16	0.050	0.050	0.022
12	0.002	0.002	0.002					15	0.053	0.053	0.023	17	0.004	0.004	0.004
9	0.005	0.005	0.007					9	0.021	0.021	0.012	19	0.010	0.010	0.006
16	0.017	0.017	0.008					22	0.004	0.004	0.004	3	0.006	0.006	0.004
17	0.003	0.003	0.003					7	0.042	0.042	0.021	11	0.016	0.016	0.007
11	0.010	0.010	0.005					3	0.005	0.005	0.004	10	0.017	0.017	0.009
1	0.002	0.002	0.002					5	0.027	0.027	0.015	14	0.004	0.004	0.004
19	0.003	0.003	0.003					21	0.008	0.008	0.08	4	0.017	0.017	0.010
20	0.003	0.003	0.003					8	0.000	0.000	0.002	15	0.004	0.004	0.004
4	0.002	0.002	0.002					4	0.004	0.004	0.004	7	0.002	0.002	0.003
2	0.007	0.007	0.005					1	0.004	0.004	0.003	1	0.003	0.003	0.003
								2	0.013	0.013	0.008				
								12	0.008	0.008	0.006				

Qgr11				Qgr12				Qgr13				Qgr20			
A	P	O	()	A	P	O	()	A	P	O	()	A	P	O	()
13	0.136	0.136	0.039	5	0.385	0.385	0.068	6	0.445	0.445	0.071	13	0.080	0.080	0.033
7	0.015	0.015	0.007	7	0.468	0.468	0.065	13	0.041	0.041	0.020	16	0.157	0.157	0.054
9	0.097	0.097	0.030	4	0.007	0.007	0.005	8	0.021	0.021	0.011	5	0.035	0.035	0.021
5	0.141	0.141	0.035	1	0.004	0.004	0.003	15	0.000	0.000	0.005	4	0.007	0.007	0.007
4	0.027	0.027	0.011	3	0.029	0.029	0.021	2	0.044	0.044	0.021	11	0.427	0.427	0.079
11	0.096	0.096	0.029	6	0.065	0.065	0.030	4	0.033	0.033	0.014	3	0.010	0.010	0.005
3	0.011	0.011	0.009	8	0.029	0.029	0.011	11	0.015	0.015	0.008	1	0.016	0.016	0.015
6	0.052	0.052	0.021	2	0.004	0.004	0.004	3	0.067	0.067	0.024	6	0.010	0.010	0.009
10	0.167	0.167	0.039	9	0.011	0.011	0.007	12	0.052	0.052	0.034	9	0.116	0.116	0.040
14	0.040	0.040	0.026					10	0.057	0.057	0.025	2	0.070	0.070	0.037
12	0.015	0.015	0.007					5	0.072	0.072	0.024	15	0.016	0.016	0.013
15	0.104	0.104	0.036					1	0.077	0.077	0.022	7	0.028	0.028	0.028
8	0.077	0.077	0.025					9	0.067	0.067	0.028	10	0.003	0.003	0.003
2	0.009	0.009	0.006					7	0.008	0.008	0.008	14	0.007	0.007	0.005
16	0.006	0.006	0.004									17	0.003	0.003	0.003
1	0.007	0.007	0.007									12	0.010	0.010	0.006
												8	0.003	0.003	0.003

A = Alelo; P = Pólen; O = Óvulo; () = intervalo de confiança a 95%. Ano base: 2010

Estudos semelhantes, enfocando o sistema de reprodução em espécies do Cerrado já apresentaram resultados similares a este. Para *Myracrodon urundeuva* Fr. All. no sudeste do Brasil, Moraes et al. (2004) detectaram de dois a três polinizadores efetivos.

Medeiros (2010), estudando *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f ex S. Moore no Cerrado do Distrito Federal, detectou média de 4,8 polinizadores efetivos em estações reprodutivas de um ano. No entanto, na mesma área de estudo, na estação reprodutiva do ano seguinte, a média de polinizadores elevou-se para 8,1 indicando que este número pode ser bem variável nas populações de acordo com cada estação reprodutiva.

A diferença entre as correlações de paternidade uniloco e multiloco tem sido utilizada para quantificar a presença de parentesco entre doadores de pólen. O valor obtido foi negativo, indicando que do pólen dos cruzamentos é bastante diversificado.

O coeficiente de coancestria estimado nas progênes foi de 0,139. Este coeficiente é uma medida de parentesco que mede a probabilidade de amostrar-se aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência (GIUDICE NETO; SEBBENN; KAGEYAMA, 2005). Para a população em estudo, existe aproximadamente 14% de probabilidade de amostrar-se dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência. Essa alta coancestria em progênes de *Q. grandiflora* Mart é consequência do sistema de reprodução da espécie e dos cruzamentos biparentais, além da endogamia nas árvores adultas, que foi de 0,38. Em progênes o índice de fixação também foi elevado (aproximadamente 27%).

A estimativa do tamanho efetivo (N_e) indicou que a representatividade genética da descendência é inferior à esperada em progênes de cruzamentos aleatórios. Ou seja: as 300 amostras analisadas correspondem a apenas 13,2 indivíduos de uma população panmítica ideal.

O valor máximo assumido por N_e para amostras de tamanho infinito, ou na ordem de centenas, em espécies alógamas é $4n$, onde n é o número de matrizes; assim, N_e /matriz poderia atingir o valor 4. O N_e /matriz, foi baixo (0,53). Este valor decorre do tamanho finito da prole da matriz (12 sementes). Por sua vez, o N_e poderia atingir o valor máximo de 100 (4×25). O valor obtido foi de 13,2 o que corresponde a 13% do máximo, revelando a existência de homozigose no conjunto das progênes, em concordância aos índices de fixação para adultos e progênes, que foi de 0,38 e 0,27 respectivamente.

As estimativas de tamanho efetivo em progênes, podem contribuir em termos práticos para delinear estratégias para a coleta de sementes e para a conservação genética da espécie. O número de árvore matrizes (m) para a coleta de sementes a fim de manter o

tamanho efetivo de referência pode ser determinado a partir deste tamanho de referência e do tamanho efetivo médio de cada matriz. Tomando-se como referencial o tamanho efetivo de 50 (FRANKEL; SOULE, 1981) e dividindo pela estimativa $Ne/matriz = 0,53$ (calculada acima) obtem-se o valor de 95 árvores para a coleta de sementes, a fim de garantir a retenção do tamanho efetivo.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Estimativas de parâmetros do sistema reprodutivo em progênies de *Q.grandiflora* Mart em Assis SP. Ano base: 2010

Parâmetro	Resultado (erro padrão)
Índice de fixação na população adulta (F)	0,38 (0,25-0,49)
Índice de fixação nas progênies (F_p)	0,270 (0,15-0,38)
Taxa de cruzamento multiloco (\hat{t}_m)	0.913 (0.021)
Taxa de cruzamento uniloco (\hat{t}_s)	0.632 (0.031)
Taxa de cruzamento entre parentes $\hat{t}_p = \hat{t}_m - \hat{t}_s$	0.281 (0.023)
Correlação de auto fecundação (\hat{r}_s)	0.235 (0.046)
Correlação de paternidade (\hat{r}_p)	0.379 (0.047)
Presença de parentesco entre doadores de pólen $\hat{r}_{p(s)} - \hat{r}_{p(m)}$	-0.143 (0.047)
Numero médio de árvores doadoras de pólen ($N_{ep} = 1 / \hat{r}_p$)	2,6
Proporção de irmãos de autofecundação ($s = 1 - \hat{t}_m$)	0,087
Proporção de meios-irmãos $t_m = 1 - \hat{r}_p$	0,654
Coancestria média dentro de progênies Θ_p	0,139 (0,105-0,177)
Tamanho efetivo das progênies (N_e)	13,2
Número de árvores para reter o tamanho efetivo de 50 (m)	95

5.4 Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que há cruzamentos endogâmicos em *Q. grandiflora* Mart e que a espécie se reproduz por alogamia, além de não ser auto-incompatível.

Uma parte considerável das progênies é aparentada no grau de irmãos completos, mas a maioria delas é parente no grau de meios-irmãos. A mistura de parentesco entre plantas de

diferentes famílias, sejam meios-irmãos e irmãos completos, reduz o tamanho efetivo do conjunto de progênies.

A coleta de sementes requer que seja utilizado um número grande de árvores (95) e de preferência de frutos distintos, visando preservar a diversidade genética da espécie. Atentando-se para este número, pode-se obter sementes com diversidade genética ideal para serem utilizadas em programas de recuperação ambiental.

Referências

- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.
- BARRET, S.C.H. e KOHN, J. The genetic and evolutionary consequences of small population size in plant: implications for conservation. In: FALK, D.; HOLSINGER, K. **Genetics and conservation of rare plants** Oxford: University Press, 1991. p. 3–30.
- COLLEVATTI, R. G., GRATTAPAGLIA, D., HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, London, v.86, p. 60-67, 2001.
- DEMPSTER A.P.; LAIRD N.M.; RUBIN D.B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm (with discussion). **Journal of the Royal Statistic Society**, London, v.39, n.1, p. 1-38, 1977.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville v.12, p.13–15, 1990.
- EFRON, B. Bootstrap methods: another look at the jackknife. **The Annals of Statistics**, Philadelphia, v.7, p.1-26. 1979.
- EFRON, B., TIBSHIRANI, R.J. **An introduction to the bootstrap**. New York: Chapman and Hall. 1993.436p
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 220 p.
- FLURY, B.; ZOPPÉ, A. Exercices in EM. **The American Statistician**, Alexandria, v.54, n.3, p.207-209, 2000
- FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.
- GOMES, C.C.; MOURA, T.M. Estrutura genética em populações de plantas do Cerrado. **Agrotecnologia**, Anápolis, v.1, n.1, p.33-51.2010

GIUDICE NETO, J. D.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto experimental. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.28, n.2, p. 409-418. 2005.

HILL, W.G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetical Research**, Cambridge, n.38, p.209–216, 1981.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer programe for the analyses of allelic data - version 1.0. Disponível em: <<http://alleun.eeb.uconn.edu/gda>>. Acesso em: 01 nov. 2010.

MEDEIROS, A. C. B. de **Fluxo de pólen e estrutura genética espacial em uma população de *Tabebuia aurea* na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF**. 2010. 124p. Tese (Doutorado). Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

McCLACHLAN G.J.; KRISHNAN T. **The EM algorithm and extensions**. New York: Wiley, 1997. 274 p.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Correlated matings in dioicous tropical tree, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Forest Genetics**, Rotorua, v.11, n.1, p. 53-59, 2004

OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E. Pollination and breeding systems of some *Vochysia* species (Polygalales-Vochysiaceae) in central Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.10, p.509-522, 1994.

PINHEIRO, E.S.; DURIGAN, G. Dinâmica espaço-temporal (1962-2006) das fitofisionomias em unidade de conservação do Cerrado no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.32, p. 441-454, 2009.

RIBEIRO, J.F.; WALTER B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S.; ALMEIDA, S.P. (Ed). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Emprapa Cerrados, 1998. p. 87-166

RITTER, L.M.O., BAJAY, M.M., MONTEIRO, M., SOUZA, R.G.V de C; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae), typical species of Brazilian Cerrado. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.99, n.3, p.97-98, 2012.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>>. Acesso em: 14 fev. 2012.

RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y.A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical and Applied Genetics**, Heilderberg, v.71, p.375-384, 1985.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v. 47, p.35-52, 1981.

SEBBENN, A.M. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, Piracicaba, v. 15, n. 2, 147-162, 2003.

SOUZA, L.M.F.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, p. 113-121, 2003

WAPLES, R.S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. **Conservation Genetics**, Netherlands, n.7, p.167-184, 2006

6 CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *Qualea grandiflora* Mart mostraram-se altamente polimórficos, fornecendo, assim, importante subsídio para continuidade dos estudos de diversidade genética da espécie.

Qualea grandiflora Mart possui preferencialmente distribuição agregada, com elevado número de indivíduos por hectare. Apresenta excesso de homozigotos em todas as populações estudadas, indicando presença de moderados índices de endogamia e desvio das proporções de Equilíbrio de Hardy – Weinberg, bem como estruturação familiar em classes de distância até 40 metros. A maior parte da divergência genética da espécie encontra-se dentro das populações.

Não há presença de clones nas populações estudadas.

A espécie reproduz-se por cruzamentos entre indivíduos, com maiores taxas de cruzamento entre não parentes do que parentes. É alógama e possui pouca pré disposição para autofecundação.

A mistura de parentesco entre diferentes famílias reduz o tamanho efetivo do conjunto de progênes. A representatividade genética da descendência é inferior à esperada em progênes de cruzamentos aleatórios: as 100 amostras analisadas correspondem a apenas 13,2 indivíduos de uma população panmítica ideal.

A coleta de sementes requer que sejam utilizadas pelo menos 95 árvores para manter o tamanho efetivo de 50, coletando de preferência de frutos distintos, visando preservar a diversidade genética da espécie e contribuir em programas de recuperação ambiental.

Todas as populações estudadas apresentam tamanho de área mínima viável para conservação da espécie a curto, médio e longo prazos. Sugere-se que sejam tratadas como Unidades Significativas Evolutivas (USE) e como Unidades Independentes para o Manejo (UIM).

ANEXO

ANEXO A - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO – DOYLE E DOYLE (1990) MODIFICADO POR FERREIRA E GRATAPAGLIA (1998)

Etapa I: Maceração mecânica de 250 mg de folhas (ou uma semente) em tubos eppendorf de 2 ml, na presença de nitrogênio líquido, com a ajuda de um bastonete para romper as paredes e membranas celulares do tecido.

Etapa II: Ressuspensão do tecido macerado em 950 ul do tampão de extração, contendo o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) em concentração de 3%, antioxidante EDTA (ácido etileno diamono tetracético) e agente tamponante, visando a solubilização de membranas lipoprotéicas e desnaturação de proteínas, enquanto o DNA é protegido da ação de enzimas de degradação. Após a suspensão, submeter as amostras à banho maria, na temperatura de 65° C, durante 60 minutos. A cada 10 minutos homogeneizar ligeiramente as amostras para facilitar a solubilização da suspensão.

Etapa III: Extração do DNA com 720 ul de clorofórmio-álcool isoamílico, (CIA, proporção 24:1), desnaturando as proteínas e tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucleicos. Separação das fases orgânica e aquosa através de centrifugação (10 minutos na velocidade de 13.000 rotações por minuto). Os lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídeos são mantidos na fase orgânica, disposta na porção inferior no eppendorf, enquanto que o DNA, RNA e alguns polissacarídeos são mantidos na fase aquosa (superior), que é transferida para um novo tubo.

Etapa IV: Precipitação do DNA que foi transferido para um novo tubo, com o uso de 550ul de isopropanol (-20° C). Manutenção overnight das amostras para que o DNA (na presença de sal e álcool) forme um precipitado (pellet), que se torna visível após ser centrifugado durante 10 minutos a uma rotação de 13000 rpm. Descarte do sobrenadante e lavagem do pellet 2 vezes com 500 ul de etanol 70% (5 minutos) e 1 vez com álcool absoluto (5 minutos). Secagem do pellet por algumas horas ou então de um dia para o outro.

Etapa V: Purificação o DNA com a ressuspensão do pellet, em 35 ul de tampão Tris-EDTA contendo RNase (15ul/ml), para degradar o RNA restando apenas DNA genômico. Colocar as amostras em banho maria à temperatura de 37° C por uma hora, sendo agitadas de 10 em 10 minutos para facilitar a diluição do DNA. Posteriormente, foram armazenadas em freezer na temperatura -20° C.