

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hymenaea
stigonocarpa* Mart. ex Hayne E *Dipteryx alata* Vogel EM ÁREAS
NATIVAS E EM PLANTIOS DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS
DEGRADADAS EM PARACATU, MG**

NATASHA BRIANEZ RODRIGUES

**ORIENTADOR: JOSÉ ROBERTO RODRIGUES PINTO
CO-ORIENTADORA: VÂNIA CRISTINA RENNÓ AZEVEDO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**PUBLICAÇÃO: PPGEFL.DM – 202/2013
Brasília/DF: Março - 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hymenaea stigonocarpa*
Mart. ex Hayne E *Dipteryx alata* Vogel EM ÁREAS NATIVAS E EM PLANTIOS DE
RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS EM PARACATU, MG**

NATASHA BRIANEZ RODRIGUES

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre.

APROVADA POR:

Prof. Dr. José Roberto Rodrigues Pinto (Departamento de Engenharia Florestal – UnB)
(Orientador)

Dr^a. Ana Yamaguishi Ciampi (Ministério do Meio Ambiente – MMA)
(Examinadora externa)

Prof^a. Dr^a. Christina Cleo Vinson Williams (Universidade Federal de Viçosa – UFV)
(Examinadora externa)

Dr^a. Tatiana Barbosa Rosado (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa)
(Examinadora suplente)

Brasília, 25 de março de 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

RODRIGUES, NATASHA BRIANEZ

Variabilidade genética de populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel em áreas nativas e em plantios de recuperação de áreas degradadas em Paracatu, MG [Distrito Federal] 2013.

xiv, 113p., 210 × 297 mm (EFL/FT/UnB, Mestre, Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Florestal).

- | | |
|------------------------------------|-------------------------|
| 1. Recuperação de áreas degradadas | 2. Cerrado |
| 3. Espécies nativas | 4. Diversidade genética |
| I. EFL/FT/UnB | II. Título (série) |

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

RODRIGUES, N. B. (2013). Variabilidade genética de populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel em áreas nativas e em plantios de recuperação de áreas degradadas em Paracatu, MG. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais, Publicação PPGEFL.DM – 202/2013, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 113p.

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Natasha Brianez Rodrigues

Título: Variabilidade genética de populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel em áreas nativas e em plantios de recuperação de áreas degradadas em Paracatu, MG.

GRAU: Mestre

ANO: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito da autora.

Natasha Brianez Rodrigues
Águas Claras, Q. 102, Bl. B, Ap. 901.
71907-000, Brasília – DF - Brasil

**A Deus,
Ao meu marido, Stephano,
Aos meus pais, Zenaide e Manoel,
Dedico**

*“Que eu não ore para ser protegido de perigos,
mas para ser destemido ao enfrentá-los.*

*Que eu não implore pelo alívio da minha dor,
mas pelo coração para superá-la.”*

Rabindranath Tagore

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela inspiração e força.

Ao meu marido, Stephano, minha rocha e meu eterno melhor amigo.

Aos meus pais, Zenaide e Manoel, que sempre me apoiaram.

Aos demais parentes que mesmo de longe torcem pela minha vitória.

Ao Departamento de Engenharia Florestal e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade de Brasília pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Dr. José Roberto Rodrigues Pinto e Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo, pela orientação e apoio durante a realização do curso.

Ao Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Cenargen e, em especial à Dr. Vânia Cristina Rennó Azevedo, pela receptividade e oportunidade de realização deste projeto nas instalações do laboratório.

Ao Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas - CRAD/UnB, Instituto Estadual de Florestas do Estado de Minas Gerais - IEF/MG de Paracatu e Centro de Treinamento e Educação Ambiental Olhos D'água – CETEA, pelo apoio institucional.

Ao José Amaro Brandão Contijo, Everton Luís da Silva e Bernadino Lemes do Prado e Dr. José Roberto Rodrigues Pinto pelo auxílio durante as coletas em campo.

A todos os pesquisadores, funcionários e estagiários do Laboratório de Genética Vegetal, pela ajuda e/ou companhia durante esse período: Vânia, Neide, Lorena, Rodrigo, Marília, Marcão, Ediene, Elaine, Bárbara, Maira, Catherine, Pedro, Tamara, Natália, Mariana, Dione, Peter, Tati, Dani, Liamar, Juliana, Vivi, Sabrina e quem mais eu possa ter esquecido.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo comparar a variabilidade genética de populações de duas espécies nativas do Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel), em plantios de recuperação de áreas degradadas e em áreas nativas de Cerrado sentido restrito, localizadas em Paracatu, MG, visando avaliar a capacidade de auto-sustentabilidade genética das populações em plantios de recuperação, bem como subsidiar estratégias locais de coleta de sementes para a recuperação de áreas degradadas. Foi coletado material foliar e de câmbio vascular de no mínimo 30 indivíduos por população de cada espécie em quatro plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e em duas áreas nativas (N1 e N2), num total de 507 indivíduos. As regiões com microssatélites foram amplificadas utilizando sete *primers* por espécie, previamente desenvolvidos. O número de alelos por loco foi superior nas populações de *H. stigonocarpa* em plantios de recuperação P1 (8,86), P2 (7), P5 (8), P6 (7,86) do que nas em áreas nativas N1 (5,43) e N2 (6,29), o que indica que as coletas de sementes foram eficientes em captar a diversidade genética local. As populações em plantios de recuperação de *H. stigonocarpa* apresentaram coeficientes de endogamia positivos e consistentes, o que aponta para a possibilidade de ocorrência de problemas de adaptação em curto prazo. Devido à alta variabilidade genética entre indivíduos, a baixa proporção de heterozigotos observada nas populações em plantios tende a diminuir com alogamia, sendo necessário manejo intensivo dos plantios para que as condições sejam propícias à sobrevivência e reprodução cruzada dos indivíduos. Não foi observada estrutura genética espacial em nenhuma das populações nativas de *H. stigonocarpa*. Devido à considerável variabilidade genética observada em ambas as populações nativas de *H. stigonocarpa*, estas podem ser utilizadas para coleta de sementes visando recuperação de áreas degradadas, não sendo necessário o uso de parâmetros de distância entre árvores-matrizes nestas populações. Com exceção de P6, as populações de *D. alata* em plantios de recuperação apresentaram número de alelos por loco ligeiramente superior (3 a 3,25) do que as populações nativas N1 (2,87) e N2 (2,5), sugerindo que as coletas de sementes foram eficientes em captar diversidade genética local. A variabilidade genética baixa entre indivíduos observada em todas as populações de *D. alata* possivelmente está associada à ocorrência de gargalos genéticos recentes detectados em ambas as populações nativas. Estes resultados indicam que poderão ocorrer problemas de adaptação em longo prazo em todas as populações avaliadas de *D. alata*. Recomenda-se, portanto, a manutenção de áreas naturais próximas às populações analisadas, de maneira a propiciar fluxo gênico e evitar a fixação de alelos nestas. Foi detectada estrutura genética espacial em N2 até a distância de 132 metros e ausência de estrutura em N1. Considerando que níveis baixos de variabilidade genética entre indivíduos parecem ser o padrão atual para a espécie, ambas as populações nativas de *D. alata* podem ser utilizadas para a realização de coleta de sementes visando recuperação de áreas degradadas, devendo ser respeitada a distância mínima de 200 metros entre árvores matrizes.

Palavras-chave: restauração ecológica, Cerrado, diversidade genética, marcadores microssatélites.

ABSTRACT

This study aimed to compare the genetic diversity of populations of two native species of Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and *Dipteryx alata* Vogel), in restoration plantations and in natural Cerrado *sensu stricto* areas, located in the town of Paracatu, Minas Gerais State, as to evaluate the genetic self-sustainability capacity of the populations in restoration plantations and to propose local strategies to collect seeds for restoration purposes. Leaf and vascular cambium material were collected from at least 30 individuals per population of each species in four restoration plantations (P1, P2, P5 and P6) and in two natural areas (N1 and N2), in a total of 507 individuals. Microsatellite regions were amplified using seven primers per species, previously developed. The number of alleles per locus was higher in *H. stigonocarpa* restoration populations P1 (8,86), P2 (7), P5 (8) and P6 (7,86) than in natural populations N1 (5,43) and N2 (6,29), which indicates that the seed collections were efficient in capturing local genetic diversity. The *H. stigonocarpa* restoration populations showed positive and significant inbreeding coefficients, which points to the possibility of these populations having problems associated with response to selection in the short term. Due to high variability between individuals, the low heterozygote proportion observed in the *H. stigonocarpa* restoration populations tends to decrease with allogamy. It is necessary, however, that these plantations are managed so that the conditions are favorable for the surviving and crossing of individuals. Spatial genetic structure was not observed in either *H. stigonocarpa* natural populations. Due to the considerable genetic diversity observed in both *H. stigonocarpa* natural populations, these can be used for seed collecting with restoration purposes, in which the use of distance parameters between seed-trees is not necessary. With the exception of P6, *D. alata* restoration populations presented slightly higher number of alleles (3 to 3,25) than N1 (2,87) and N2 (2,5), which suggests that seed collecting was efficient in capturing local genetic diversity. The low genetic variability between individuals observed in all *D. alata* populations may be associated to the detected occurrence of recent genetic bottlenecks in both natural populations. These results indicate that adaptation problems might occur in the long term in all evaluated *D. alata* populations. The maintenance of natural areas nearby the analyzed populations is recommended, so that gene flow is enabled and allele fixation is avoided. Spatial genetic structure was detected in N2 in distances up to 132 meters, but it was not detected in N1. Considering that low levels of genetic variability between individuals seem to be the current pattern for the species, both *D. alata* natural populations can be used to collect seeds aiming restoration, in which the minimum distance of 200 meters between seed-trees must be respected.

Key-words: restoration ecology, Cerrado, genetic diversity, microsatellite markers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O CERRADO	3
2.2. RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS E VARIABILIDADE GENÉTICA.....	4
2.3. COLETA DE GERMOPLASMA PARA CONSERVAÇÃO.....	7
2.4. GENÉTICA DE POPULAÇÕES	9
2.4.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	9
2.4.2. Variabilidade genética em populações.....	10
2.4.3. Estrutura genética espacial.....	11
2.5. MARCADORES MOLECULARES E MARCADORES MICROSSATÉLITES 13	
2.6. ESPÉCIES ALVO	16
2.6.1. Jatobá-do-Cerrado (<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne)	16
2.6.2. Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vogel.).....	20
2.7. CENTRO DE REFERÊNCIA EM CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS (CRAD)	24
3. VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne EM ÁREAS NATIVAS E EM PLANTIOS DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS EM PARACATU, MG.....	26
3.1. INTRODUÇÃO.....	26
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.2.1. Áreas de estudo.....	28
3.2.2. Amostragem das populações e coleta de material	29
3.2.3. Procedimentos laboratoriais	31
3.2.4. Análise de dados.....	34
3.3. RESULTADOS	38
3.3.1. Variabilidade genética	38
3.3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação.....	50
3.3.3. Estrutura genética espacial.....	52
3.4. DISCUSSÃO.....	54
3.4.1. Variabilidade genética	54
3.4.2. Estrutura genética espacial.....	58
3.5. CONCLUSÃO.....	61

4. VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Dipteryx alata</i> Vogel EM ÁREAS NATIVAS E EM PLANTIOS DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS EM PARACATU, MG	62
4.1. INTRODUÇÃO.....	62
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.2.1. Áreas de estudo, amostragem das populações e coleta de material.....	64
4.2.2. Procedimentos laboratoriais	64
4.2.3. Análise de dados.....	65
4.3. RESULTADOS	66
4.3.1. Variabilidade genética	66
4.3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação.....	79
4.3.3. Estrutura genética espacial.....	80
4.4. DISCUSSÃO.....	83
4.4.1. Variabilidade genética	83
4.4.2. Estrutura genética espacial.....	86
4.5. CONCLUSÃO.....	88
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Características das áreas de plantios, em processo de recuperação, localizadas próximas ao município de Paracatu - MG.....	29
Tabela 3.2. <i>Primers</i> para <i>H. stigonocarpa</i> , temperaturas de anelamento utilizadas e amplitudes alélicas obtidas.....	33
Tabela 3.3. Tamanho amostral (n), número de alelos (A), alelos privados (Ap), heterozigiosidade máxima ($Hmáx$), heterozigiosidade esperada (He), heterozigiosidade observada (Ho), relação entre heterozigiosidades esperada e máxima ($He/Hmáx$), relação entre heterozigiosidades observada e esperada (Ho/He) e coeficiente de endogamia (f) das populações de <i>H. stigonocarpa</i> nas áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e nas áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, MG, para os sete locos avaliados.....	39
Tabela 3.4. Tamanho amostral (n), número de alelos (A), número de alelos privados (Ap) encontrados nas populações, heterozigiosidade máxima ($Hmáx$), heterozigiosidade esperada (He), heterozigiosidade observada (Ho), relação entre heterozigiosidades esperada e máxima ($He/máx$) e coeficiente de endogamia (f) para os locos analisados.....	41
Tabela 3.5. Tamanho amostral (n), tamanho efetivo populacional (Ne), relação entre tamanho amostral e tamanho efetivo populacional (Ne/n), população mínima viável com tamanho efetivo de referência de 50 ($PMV(Neref=50)$) e de 500 ($PMV(Neref=500)$) das populações de <i>H. stigonocarpa</i> nas áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e nas áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, para os sete locos avaliados.....	49
Tabela 3.6. Valores de divergência genética (θp) entre pares de populações de <i>H. stigonocarpa</i> em áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e em áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, MG, e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, com base em 10.000 reamostragens <i>bootstrap</i> (entre parênteses).....	52
Tabela 3.7. Local de estudo, tamanho amostral (n), número de alelos médio por loco (A), heterozigiosidade esperada (He), heterozigiosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (f) observados no presente trabalho e em outros trabalhos realizados sobre variabilidade genética de populações de <i>H. stigonocarpa</i> através de marcadores microssatélites.....	55
Tabela 4.1. <i>Primers</i> para <i>D. alata</i> , temperaturas de anelamento utilizadas e amplitudes alélicas obtidas.....	64
Tabela 4.2. Tamanho amostral (n), número de alelos (A), alelos privados (Ap), heterozigiosidade máxima ($Hmáx$), heterozigiosidade esperada (He), heterozigiosidade observada (Ho), relação entre heterozigiosidades esperada e máxima ($He/Hmáx$), relação entre heterozigiosidades observada e esperada (Ho/He) e coeficiente de endogamia (f) das populações de <i>D. alata</i> nas áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e nas áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, MG, para os oito locos avaliados.....	67

Tabela 4.3. Média do tamanho amostral (n), número de alelos (A), número de alelos privados (A_p) encontrados nas populações, heterozigosidade máxima ($H_{máx}$), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), relação entre heterozigosidades esperada e máxima ($H_e/máx$) e coeficiente de endogamia (f) para os oito locos analisados em seis populações de <i>D. alata</i> em Paracatu, MG.....	69
Tabela 4.4. Número de locos com heterozigosidade esperada maior do que a heterozigosidade sob equilíbrio de mutação e deriva, de oito locos analisados (<i>Locos $H_e > H_{eq}$</i>) e P-valores para o teste de Wilcoxon, significativo quando $p < 0,05$ (<i>P-valores Wilcoxon</i>) para as duas populações nativas de <i>D. alata</i> , N1 e N2, para três modelos de mutação, IAM, TPM e SMM.	77
Tabela 4.5. Tamanho amostral (n), tamanho efetivo populacional (N_e), relação entre tamanho amostral e tamanho efetivo populacional (N_e/n), população mínima viável com tamanho efetivo de referência de 50 ($PMV(N_{eref}=50)$) e de 500 ($PMV(N_{eref}=500)$) das populações de <i>D. alata</i> nas áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e nas áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, para os oito locos avaliados.....	78
Tabela 4.6. Valores de divergência genética (θ_p) entre pares de populações de <i>D. alata</i> em áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e em áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, MG, e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, com base em 10.000 reamostragens <i>bootstrap</i> (entre parênteses).....	81
Tabela 4.7. Local de estudo, tamanho amostral (n), número de alelos médio por loco (A), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (f) observados no presente trabalho e em outros trabalhos realizados sobre variabilidade genética de populações de <i>D. alata</i> através de marcadores microssatélites.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Imagens de <i>H. stigonocarpa</i> . A. Árvore. B. Flor. C. Fruto e sementes. D. Tronco. E. Folhas. Fonte: Fernando Tatagiba.....	17
Figura 2.2. Imagens de <i>D. alata</i> . A. Folhas e inflorescências. B. Árvore C. Fruto. D. Sementes. E. Tronco. Fonte: LORENZI (2002).....	21
Figura 2.3. Ações realizadas pelo Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas - Universidade de Brasília (CRAD/UnB). A. Plantio de recuperação em área degradada como ação de revitalização da Bacia do São Francisco, em Paracatu – MG. B. Produção de mudas de espécies nativas do Cerrado. C. Mapa de uso do solo no município de Paracatu – MG, indicando a localização das 28 áreas em recuperação, através das ações do CRAD/UnB.....	25
Figura 3.1. Localização do município de Paracatu, MG, dos plantios de recuperação de áreas degradadas (P1, P2, P5 e P6) e das áreas nativas de Cerrado sentido restrito (N1 e N2). Fonte: Google Maps (A e B) e Google Earth (C).....	29
Figura 3.2. Coleta de material. A. Material foliar embalado e identificado. B. Processo de retirada de material de câmbio vascular. C. Microtubo contendo tampão de transporte e material de câmbio coletado.....	31
Figura 3.3. Extração e quantificação de DNA. A. Processo de extração de DNA B. Quantificado de DNA extraído em gel de agarose.....	32
Figura 3.4. Amplificação e genotipagem de locos SSR. A. Verificação de ocorrência de amplificação de locos microssatélites em gel de agarose. B. Genotipagem de indivíduo heterozigoto para o loco sob análise através do <i>software GeneMapper</i>	34
Figura 3.5. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de <i>H. stigonocarpa</i> em área de plantio de recuperação – P1, amostrada em Paracatu, MG.....	43
Figura 3.6. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de <i>H. stigonocarpa</i> em área de plantio de recuperação – P2, amostrada em Paracatu, MG.....	44
Figura 3.7. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de <i>H. stigonocarpa</i> em área de plantio de recuperação – P5, amostrada em Paracatu, MG.....	45
Figura 3.8. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de <i>H. stigonocarpa</i> em área de plantio de recuperação – P6, amostrada em Paracatu, MG.....	46
Figura 3.9. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de <i>H. stigonocarpa</i> em área nativa de Cerrado sentido restrito – N1, amostrada em Paracatu, MG.....	47

Figura 3.10. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de <i>H. stigonocarpa</i> em área nativa de Cerrado sentido restrito – N2, amostrada em Paracatu, MG.....	48
Figura 3.11. Correlograma para coeficiente de coancestria (●) estimado por classes de distâncias, seu intervalo de confiança a 95% (---) e intervalo de confiança a 95% para teste de ausência de estrutura genética espacial (--) para a população nativa de <i>H. stigonocarpa</i> N1, amostrada em Paracatu, MG.....	53
Figura 3.12. Correlograma para coeficiente de coancestria (●) estimado por classes de distâncias, seu intervalo de confiança a 95% (---) e intervalo de confiança a 95% para teste de ausência de estrutura genética espacial (--) para a população nativa de <i>H. stigonocarpa</i> N2, amostrada em Paracatu, MG.....	54
Figura 4.1. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de <i>D. alata</i> em área de plantio de recuperação – P1, amostrada em Paracatu, MG.....	70
Figura 4.2. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de <i>D. alata</i> em área de plantio de recuperação – P2, amostrada em Paracatu, MG.....	71
Figura 4.3. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de <i>D. alata</i> em área de plantio de recuperação – P5, amostrada em Paracatu, MG.....	72
Figura 4.4. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de <i>D. alata</i> em área de plantio de recuperação – P6, amostrada em Paracatu, MG.....	73
Figura 4.5. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de <i>D. alata</i> em área nativa de Cerrado sentido restrito – N1, amostrada em Paracatu, MG.....	74
Figura 4.6. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de <i>D. alata</i> em área nativa de Cerrado sentido restrito – N2, amostrada em Paracatu, MG.....	75
Figura 4.7. Correlograma para coeficiente de coancestria (●) estimado por classes de distâncias, seu intervalo de confiança a 95% (---) e intervalo de confiança a 95% para teste de ausência de estrutura genética espacial (--) para a população nativa de <i>D. alata</i> N1, amostrada em Paracatu, MG.....	82
Figura 4.8. Correlograma para coeficiente de coancestria (●) estimado por classes de distâncias, seu intervalo de confiança a 95% (---) e intervalo de confiança a 95% para teste de ausência de estrutura genética espacial (--) para a população nativa de <i>D. alata</i> N2, amostrada em Paracatu, MG.....	82

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	- Número de alelos por loco
Ap	- Número de alelos privados
CRAD	- Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas
f	- Coeficiente de endogamia
He	- Heterozigosidade esperada
$Hmáx$	- Heterozigosidade máxima
Ho	- Heterozigosidade observada
IAM	- Modelo de Alelos Infinitos
n	- tamanho amostral
N1	- Área nativa de Cerrado sentido restrito 1 (Figura 3.1)
N2	- Área nativa de Cerrado sentido restrito 2 (Figura 3.1)
Ne	- Tamanho efetivo populacional
$Ne(ref)$	- Tamanho efetivo populacional de referência
Nm	- Número de migrantes por geração
P1	- Plantio de recuperação em área degradada 1 (Tabela 3.1)
P2	- Plantio de recuperação em área degradada 2 (Tabela 3.1)
P5	- Plantio de recuperação em área degradada 5 (Tabela 3.1)
P6	- Plantio de recuperação em área degradada 6 (Tabela 3.1)
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia através da polimerase)
PMV	- População mínima viável
SMM	- Modelo de Passos de Mutação
SSR	- <i>Simple Sequence Repeat</i> (microsatélite)
TPM	- Modelo de Duas Fases
θp	- Divergência genética entre populações
θxy	- Coeficiente de coancestria

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é considerado uma das áreas mais ricas e ameaçadas do mundo, com várias espécies endêmicas, constituindo, assim, um dos 34 *hotspots* para conservação da biodiversidade do planeta (MYERS et al., 2000; KIER et al., 2005; MITTERMEIER et al., 2005; BROOKS et al., 2006). Apesar da sua importância, o Cerrado apresenta alto grau de ameaça, com estimativa de área ainda coberta por vegetação nativa de 60,5% (SANO et al., 2007; SANO et al., 2009). Tal porcentagem, entretanto, é reduzida para cerca de 46,7% se as pastagens nativas forem incluídas na categoria de áreas antropizadas e não como vegetação nativa (MMA, 2007).

A ocupação do Cerrado ocorre devido a processos como expansão das áreas urbanas e principalmente ocupação das áreas nativas pelas atividades agrícola e pecuária, sendo que essas duas últimas ocupam 10,5% e 26,5% desta região, respectivamente (SANO et al., 2008). Dessa maneira, a recuperação de áreas degradadas ocupa posição importante como estratégia para a conservação do Cerrado, sendo apontada como a segunda ação prioritária para este Domínio Fitogeográfico (BRASIL, 2007).

De acordo com KAGEYAMA & GANDARA (2000), a recuperação de áreas degradadas deve ter como objetivo não apenas resgatar a representatividade das espécies antes existentes naquele ecossistema, mas também a diversidade genética das suas populações. Apesar da questão da variabilidade genética ser negligenciada na grande maioria dos projetos e iniciativas de plantios de recuperação, a mesma possui grande importância ecológica e econômica, visto que permitirá que os plantios sejam auto-sustentáveis e não requeiram futuras intervenções humanas (BRANCALION et al., 2009).

A ausência de boa base genética em populações implantadas em plantios de recuperação pode resultar numa série de problemas, como aumento da deriva genética, endogamia, diminuição do crescimento e da capacidade adaptativa e reprodutiva (KAGEYAMA et al., 1998; SCARIOT, 1998; FALK et al., 2001; HOBBS, 2006). Estes problemas, por sua vez, de acordo com estes autores, podem levar à morte dos indivíduos, à não formação das próximas gerações e à extinção local da espécie, fazendo com que os esforços realizados para promover a recuperação da área sejam perdidos.

Nesse sentido surge a seguinte pergunta: as populações de espécies nativas utilizadas em recuperação de áreas degradadas apresentam suficiente variabilidade

genética para manter a sustentabilidade dos plantios em longo prazo, em comparação com populações em áreas nativas? Assim, esse trabalho tem como objetivo analisar e comparar a variabilidade genética de populações de duas espécies nativas do Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel), em quatro plantios de recuperação de áreas degradadas e em duas áreas nativas de Cerrado sentido restrito, localizadas em Paracatu (MG), através de marcadores microssatélites. A partir desses resultados espera-se avaliar a capacidade de auto-sustentabilidade genética das populações em plantios de recuperação e a conservação em longo prazo, bem como subsidiar estratégias locais de coleta de germoplasma para futuras ações de recuperação de áreas degradadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O CERRADO

O Cerrado está situado entre as coordenadas 5° e 20° de latitude Sul e 45° e 60° de longitude Oeste e é a segunda maior formação vegetal do Brasil, com cerca de dois milhões de quilômetros quadrados, fazendo limite com a Floresta Amazônica, Caatinga, Pantanal e Floresta Atlântica (RIBEIRO & WALTER, 2008; SILVA et al., 2008). O clima do Cerrado apresenta duas estações bem definidas: uma seca, de maio a setembro, e outra chuvosa, de outubro a abril, com precipitação média anual entre 600 a 2000, apresentando temperaturas entre 22° C e 27° C em média (LIMA & SILVA, 2008; SILVA et al., 2008).

De acordo com REATTO et al. (2008), a principal classe de solo do Cerrado são os Latossolos, os quais representam aproximadamente 48,66% da região, ocorrendo também Neossolos Quartzarênicos, que ocupam cerca de 15% da área deste Domínio Fitogeográfico, além de outras classes de solos menos frequentes. Assim, a maior parte dos solos do Cerrado é composta por solos antigos, intemperizados, ácidos, pobres em nutrientes e com altas concentrações de alumínio (HARIDASAN, 2000).

A vegetação do Cerrado é caracterizada como mosaico de diferentes fitofisionomias, as quais englobam formações florestais, savânicas e campestres (RIBEIRO & WALTER, 2008). De acordo com estes autores, as formações florestais incluem a Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão; as savânicas incluem o Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda; as campestres, por sua vez, incluem o Campo Sujo, Campo Limpo e Campo Rupestre.

Diante desta heterogeneidade de paisagem, a biodiversidade do Cerrado é bastante elevada e o número de plantas vasculares é superior ao encontrado na maioria das regiões do mundo (KIER et al., 2005), sendo cerca de 44% da flora endêmica a este Domínio Fitogeográfico (KLINK & MACHADO, 2005). No *checklist* de espécies da flora vascular catalogadas para o Cerrado por MENDONÇA et al. (2008) foram registradas 12.356 espécies. De acordo com estes autores, a alta de riqueza florística do Cerrado se deve especialmente à sua grande variedade de paisagens e fitofisionomias, além da posição deste na América do Sul que permite amplo contato e intercâmbio com diferentes biomas.

De acordo com BRASIL (2007), as ações prioritárias para conservação da biodiversidade do Cerrado são: manejo e uso sustentável, recuperação de áreas degradadas e redução ou redirecionamento de pressões antrópicas. O termo biodiversidade foi definido por NOSS & COOPERRIDER (1994) como a variedade da vida e seus processos, incluindo a variedade de organismos vivos, as diferenças genéticas entre estes, as comunidades e ecossistemas em que os mesmos ocorrem e os processos ecológicos e evolutivos que os mantêm funcionando, mudando e se adaptando. Assim, todas ações a serem efetuadas para a conservação devem considerar a diversidade genética, a qual é essencial para a sobrevivência em longo prazo e evolução das populações e espécies (FINKELDEY & HATTEMER, 2007; WHITE et al., 2007).

2.2. RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS E VARIABILIDADE GENÉTICA

O desenvolvimento da recuperação de áreas degradadas como ciência depende de diversas áreas de conhecimento e é bastante recente. RODRIGUES et al. (2009) dividem a história da evolução das ações de recuperação de áreas degradadas no Brasil em cinco fases, com início em meados do século XVIII. A primeira fase (1862 – 1982) corresponde aos primeiros projetos de recuperação, os quais intencionavam apenas proteger recursos como solo e água e não biodiversidade ou processos ecológicos. Na segunda fase (1982 – 1985), se iniciou a incorporação de conhecimento sobre sucessão florestal, com foco na estrutura florestal e utilização de poucas espécies de crescimento rápido em altas densidades, o que resultou em problemas de auto-perpetuação. O início da preocupação com a diversidade genética ocorreu na terceira fase (1985 – 2000), a qual se caracterizou pela tentativa de copiar a composição e estrutura de florestas naturais, com a utilização do sistema de módulos de plantios e maior diversidade de espécies. Na quarta fase (2000-2003), os objetivos deixaram de ser copiar florestas nativas e se tornaram restaurar processos ecológicos básicos através de estímulos à aceleração da sucessão, buscando resgatar a habilidade da floresta de auto-manutenção, utilizando conhecimento sobre a biologia das espécies. A quinta fase (2003 – presente) compreende os esforços atuais de considerar a diversidade genética, por esta ser elemento chave na manutenção e evolução de qualquer sistema florestal, dando maior atenção para origem das sementes, para a diversidade genética pré-existente e para a distribuição espacial das espécies.

Assim, a diversidade genética a ser inserida na área em recuperação é um dos futuros desafios para o desenvolvimento da ecologia da restauração (BRANCALION et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009). Em muitos países desenvolvidos essa questão já se tornou tão importante a ponto de ser criada nova área de pesquisa, denominada de Genética da Restauração (*Restoration Genetics*) (LESICA & ALLENDORF, 1999; FALK et al., 2001; HUFFORD & MAZER, 2003; RICE & EMERY, 2003; MCKAY et al., 2005; RAMP et al., 2006; BROADHURST et al., 2008; MENGES, 2008; BOUZAT et al., 2009).

Do ponto de vista da recuperação de áreas degradadas, a diversidade genética é importante devido principalmente a dois aspectos: provê a base para a adaptação dos genótipos a ambientes variáveis e evolução ao longo do tempo e previne os efeitos deletérios da endogamia em populações pequenas ou isoladas (HOBBS, 2006). Além disso, segundo este autor, a variabilidade genética pode afetar a sobrevivência e desempenho dos indivíduos, necessários em qualquer tipo de implantação de plantio de recuperação. Apesar de os efeitos da homogeneidade genética em população introduzida poderem não ser imediatamente evidentes, após alguns anos a população pode apresentar taxas menores de sobrevivência, crescimento e reprodução e persistir com menos sucesso em períodos de variabilidade ambiental (FALK et al., 2001).

O atual desafio para a recuperação de áreas degradadas é utilizar diversidade genética suficiente para permitir adaptações às novas circunstâncias e evolução ao longo do tempo, bem como evitar os efeitos adversos da introdução de genótipos mal adaptados aos ambientes a serem recuperados (RICE & EMERY, 2003). Estudos na área de Genética da Restauração buscam determinar a extensão da adaptação local dos genótipos às populações em foco e os riscos potenciais de introdução de genótipos estrangeiros, incluindo efeito fundador, supressão genética e depressão exogâmica (HUFFORD & MAZER, 2003).

O efeito fundador ocorre quando são coletadas sementes de número limitado de fontes, resultando em gargalos genéticos (HUFFORD & MAZER, 2003). A supressão genética, segundo estes autores, refere-se ao rápido aumento na frequência de um genótipo ou alelo introduzido que pode levar à substituição dos genótipos locais, sendo causada pela ausência de hibridização interespecífica devido à vantagem numérica e/ou adaptativa dos genótipos introduzidos. A depressão exogâmica, por sua vez, refere-se à redução da adaptação de indivíduos originados através da hibridização entre parentais de populações

geneticamente distintas, podendo ocorrer devido à diluição ou ao colapso híbrido (*hybrid breakdown*).

Nesse sentido, um dos princípios básicos para a coleta de sementes com a finalidade de recuperar áreas degradadas é a captação e conservação de suficiente diversidade genética das espécies para o estabelecimento de populações auto-sustentáveis (BROADHURST et al., 2008). A recuperação de áreas degradadas através de plantios requer vasta quantidade de germoplasma, sendo recomendado utilizar fontes locais para maximizar a adaptação, coletar germoplasma com tamanhos amostrais de indivíduos e de populações adequados e representativos, tendo as populações bom tamanho efetivo e integridade ecológica e genética (VENCOVSKY, 1987; KAGEYAMA & GANDARA, 2005; MCKAY et al., 2005; BROADHURST et al., 2008).

O “pool gênico” para projetos de recuperação de áreas degradadas é inevitavelmente limitado pela diversidade da amostra inicial, pois, apesar de outros genes poderem adentrar a área ao longo do tempo, através de dispersão de gametas e reintroduções adicionais, o “pool” de diversidade genética da amostra inicial irá governar o desempenho das populações introduzidas por longo período (FALK et al., 2001). Assim, segundo estes autores, a diversidade genética do material de propagação utilizado é uma consideração muito importante no âmbito da recuperação de áreas degradadas.

Outro aspecto a ser considerado é o tamanho efetivo populacional (N_e), o qual pode ser entendido como o número de indivíduos que representam geneticamente a população (VENCOVSKY, 1987). Se o N_e for inferior ao tamanho mínimo viável para conservação podem ocorrer, em curto prazo, problemas genéticos associados com a intensificação da deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original (KAGEYAMA et al., 1998; SCARIOT, 1998). Em longo prazo, de acordo com estes autores, podem ocorrer problemas associados ao aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamento entre indivíduos aparentados, levando a dificuldades reprodutivas e de sobrevivência e, possivelmente, à extinção local.

Assim, o planejamento da recuperação de áreas degradadas considerando apenas o número de indivíduos é falho, pois não diz respeito à efetiva contribuição genética dos indivíduos para as próximas gerações, visto que estes apresentam diferenças genéticas e

reprodutivas (KAGEYAMA et al., 1998). Deve ser considerado, portanto, o tamanho efetivo populacional existente, o tamanho populacional mínimo viável necessário para a manutenção das populações ao longo do tempo e os fatores que os influenciam (HOBBS, 2006).

2.3. COLETA DE GERMOPLASMA PARA CONSERVAÇÃO

A conservação de recursos genéticos vegetais pode ser efetuada através da proteção de populações na natureza (*in situ*) ou através da preservação de amostras em jardins botânicos, bancos de germoplasmas e coleções de culturas de tecidos (*ex situ*) (COHEN et al., 1991; SILVA & SALOMÃO, 2005; LI & PRITCHARD, 2009). A conservação *in situ* é um método importante de conservação, porém desastres naturais e de origem humana, assim como o desenvolvimento humano, estão colocando espécies em áreas protegidas e desprotegidas sob pressão considerável (LI & PRITCHARD, 2009). A conservação *ex situ* atua como apoio para a conservação de certos segmentos da diversidade que poderiam ser perdidos em ecossistemas naturais ou antropogenizados, sendo ambos os métodos importantes e complementares (COHEN et al., 1991; HAVENS et al., 2006).

As estratégias utilizadas para coleta de germoplasma para conservação *ex situ*, assim como para recuperação de áreas degradadas, porém, são difíceis de serem definidas, pois devem se adequar à espécie, região, população e ao objetivo da coleta, além da amostra de germoplasma dever ter o maior tamanho e o máximo de diversidade genética possíveis (BROWN & MARSHALL, 1995). Além disso, devem ser considerados fatores ecológicos e condições ambientais do local de coleta. Por exemplo, a coleta de sementes de indivíduos que estão frutificando fora de época em relação a outros da mesma espécie no local deve ser evitada, visto isto pode ocorrer devido a algum estresse ou doença, produzindo, geralmente, sementes pobres e abortadas (FELFILI et al., 2000). Assim, a maneira com que a coleta de germoplasma é feita é muito importante, pois definirá qual fração dos recursos genéticos existentes será conservada e possivelmente qual será extinta caso ocorra rápida erosão genética, devendo os tamanhos amostrais de populações e de indivíduos ser adequados e representativos (BROWN & MARSHALL, 1995).

Com relação à coleta de germoplasma visando conservação *ex situ*, diversos autores recomendam diferentes tamanhos amostrais de indivíduos por população dos quais deve ser coletado germoplasma para que a variabilidade genética da população seja

representada. MARSHALL & BROWN (1975) sugerem que, na ausência de informação sobre a espécie, devem ser amostrados de 50 a 100 indivíduos por população, no maior número de populações possível. Esta recomendação é corroborada por HAWKES (1981), que adicionalmente sugerem que sejam coletadas cerca de 50 sementes por indivíduo. VENCOVSKY (1987), porém, considera tal referência um tanto vaga e ressalta a importância da coleta de número grande de indivíduos, visto que, em espécies alógamas, grande número de sementes coletadas de uma única planta não representa mais do que quatro sementes colhidas de quatro plantas. A FAO (1995) recomenda tamanhos amostrais de 25 a 50 indivíduos por população de espécies arbóreas. Esta recomendação é corroborada por FELFILI et al. (2006) para uso em recuperação de áreas degradadas no Cerrado. Semelhantemente, SEBBENN (2002; 2006) sugere tamanho amostral mínimo de 45 árvores matrizes. BROWN & MARSHALL (1995), considerando o sistema reprodutivo da espécie, sugerem tamanhos amostrais de 30 indivíduos para espécies alógamas, 30 genótipos para espécies apomíticas e 59 indivíduos para espécies autógamas.

Com relação à distância adotada entre árvores matrizes a serem amostradas para coleta de sementes, SEBBENN (2002; 2006) sugere distâncias de pelo menos 100 metros ou duas vezes a altura da árvore para evitar coleta de propágulos de indivíduos aparentados. Isso corrobora com a FAO (1995), segundo a qual o espaçamento entre árvores matrizes a serem amostradas deve ser em intervalos não menores do que a distância normal de dispersão de sementes da espécie, sendo a regra comum manter distância mínima de 100 a 200 metros entre indivíduos. A distância de 100 metros entre matrizes também é recomendada por FELFILI et al (2006) especificamente para uso em projetos de recuperação de áreas degradadas no Cerrado. Esta distância deve ser maior em espécies com baixa dispersão de sementes, reprodução vegetativa ou apomítica do que em espécies com dispersão de sementes a longa distância eficiente, como espécies anemocóricas, hidrocóricas e zoocóricas (FAO, 1995).

VENCOVSKY et al. (2007) atentam para a importância do uso do tamanho efetivo populacional para mensuração da representatividade genética do conjunto de indivíduos amostrados, sendo necessário definir primeiramente o tamanho efetivo populacional de referência em função das características da espécie e da população, não existindo tamanho efetivo ideal. Estes autores sugerem, ainda, a técnica do controle gamético feminino como prática para aumentar a representatividade genética e diminuir a possibilidade de perda de alelos nas amostras. Esta técnica consiste em coletar número igual ou aproximadamente

igual de sementes de cada planta matriz, e considera mais importante coletar poucas sementes de muitos indivíduos, possibilitando que sejam obtidos tamanhos efetivos maiores com relação ao mesmo tamanho amostral (VENCOVSKY, 1987; VENCOVSKY et al., 2007). Tal técnica é recomendada de maneira indireta por FELFILI et al. (2006) para uso em recuperação de áreas degradadas no Cerrado, segundo os quais sementes coletadas em diferentes árvores matrizes devem ter número ou peso igual para cada população a ser implantada.

2.4. GENÉTICA DE POPULAÇÕES

2.4.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O termo população é definido por FUTUYMA (1995) como o grupo de organismos da mesma espécie que ocupa região geográfica mais ou menos definida e exhibe continuidade reprodutiva ao longo das gerações. Genética de populações, por sua vez, trata do estudo da variação genética espacial ou temporal em populações e dos mecanismos de perda e manutenção desta variabilidade (LEWONTIN, 1974; NEI, 1977). Essa área de estudo é capaz de fornecer a base para o entendimento das dinâmicas de estruturas genéticas e evolução, as quais são utilizadas como suporte para estudos de conservação genética (FINKELDEY & HATTEMER, 2007). Assim, estudos de genética de populações são essenciais para a elaboração de estratégias efetivas para conservação da biodiversidade do Cerrado.

De acordo com HARTL & CLARK (1997) e YEH (2000), o princípio de Hardy-Weinberg sustenta a base para toda a genética de populações. Este princípio afirma que quando a população é infinitamente grande, panmítica, na ausência de seleção, mutação ou migração, as frequências alélicas e genotípicas são constantes de uma geração para a outra (HARTL & CLARK, 1997; GILLESPIE, 1998; YEH, 2000). Estas discrepâncias entre população ideal de Hardy-Weinberg e populações reais são os ingredientes da evolução (FUTUYMA, 1995). Apesar destes critérios rigorosos associados com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, muitas populações naturais grandes e com reprodução cruzada estão neste equilíbrio porque os efeitos das forças evolutivas nestas populações é pequeno, ou, ainda, se anulam (FREELAND, 2005).

A compreensão do por que da ocorrência de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode trazer informações importantes como existência de seleção sob o loco em

análise ou existência de endogamia na população em estudo (FREELAND, 2005), o que contribui para análise do estado de conservação de populações nativas. Tal desvio, porém, de acordo com a autora, pode advir de erros devido a tamanhos amostrais inapropriados ou a amostragem de duas ou mais populações como se fossem uma, o que pode causar o efeito Wahlund e resultar em maior proporção de homozigotos na amostra do que se as populações fossem analisadas separadamente. Outra fonte de erros é a presença de alelos que consistentemente não são amplificados durante a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com o uso de marcadores microssatélites, devido principalmente a mutações em uma ou em ambas regiões de anelamento dos *primers* no DNA (CALLEN et al., 1993). Segundo estes autores, tais alelos, chamados de alelos nulos, não são detectados na genotipagem dos indivíduos, levando à detecção errônea de maior quantidade de homozigotos.

2.4.2. Variabilidade genética em populações

A diversidade genética dentro de populações pode ser quantificada através de diferentes parâmetros, sendo os principais: proporção de locos polimórficos, riqueza alélica e heterozigosidade média (YEH, 2000; ALLENDORF & LUIKART, 2007). A proporção de locos polimórficos é utilizada mais frequentemente em estudos baseados em marcadores aloenzimáticos, sendo bastante desinformativa quanto à diversidade genética em estudos baseados em marcadores variáveis como microssatélites (ALLENDORF & LUIKART, 2007). Um loco é geralmente considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum é inferior a 0,95 (em casos de tamanhos amostrais inferiores a 50) ou 0,99 (em casos de tamanhos amostrais superiores a 50) (NEI, 1987).

O número total de alelos por loco é um bom parâmetro para estudar perda de diversidade genética e potencial evolutivo das populações, porém é altamente dependente do tamanho amostral, podendo causar viés comparativos caso sejam comparadas populações com diferentes tamanhos amostrais (ALLENDORF & LUIKART, 2007). No caso das populações apresentarem tamanhos amostrais diferentes, as estimativas de riqueza alélica devem ser corrigidas através de métodos de padronização com base no menor tamanho amostral, como rarefação ou subamostragem randomizada repetida (LEBERG, 2002).

A heterozigosidade média esperada se refere à proporção média de heterozigotos por loco em população panmítica ou à proporção esperada de locos heterozigotos em

indivíduos selecionados aleatoriamente (NEI, 1987). Este parâmetro é considerado por ALLENDORF & LUIKART (2007) como pouco sensível ao tamanho amostral e bastante informativo, sendo boa medida da resposta populacional à seleção, além de ser capaz de fornecer estimativas de coeficientes de endogamia e poder ser utilizado como base para análise de reduções populacionais. Enquanto a heterozigosidade média esperada é calculada com base nas frequências alélicas, sendo o que seria observado caso a população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a heterozigosidade média observada é a proporção real de heterozigotos, ou seja, se baseia nos genótipos observados (GILLESPIE, 1998).

O tamanho efetivo populacional (N_e) é considerado como outro importante parâmetro na análise de diversidade genética de populações. Este conceito foi primeiramente introduzido e definido por WRIGHT (1931; 1938), como o número de indivíduos reprodutivos em uma população ideal que teria a mesma intensidade de dispersão de frequências alélicas sob deriva genética ou a mesma intensidade de endogamia que a população sob análise. O N_e permite a estimativa e comparação com o tamanho mínimo viável ou mínimo adequado, o qual assegura que a população mantenha a viabilidade ao longo do tempo e que exista sustentabilidade genética na sua descendência (VENCOVSKY, 1992).

Segundo HARTL & CLARK (1997), existem três tipos de tamanhos efetivos populacionais, classificados com base no parâmetro utilizado para medir sua magnitude: tamanho efetivo de endogamia, calculado a partir de mudanças no coeficiente de endogamia médio; tamanho efetivo de variância, calculado a partir de mudanças na variância de frequências alélicas; e tamanho efetivo de autovalor, calculado a partir de taxas de perda de heterozigosidade. O mais disseminado e utilizado dos três é o tamanho efetivo de endogamia, o qual pode ser interpretado da seguinte maneira: se uma população de 50 indivíduos apresenta tamanho efetivo igual a 25, é esperado que esta população produza o mesmo número de progênies endogâmicas que população panmítica com 25 indivíduos produziria (FINKELDEY & HATTEMER, 2007).

2.4.3. Estrutura genética espacial

A estrutura genética, a qual está inserida no âmbito da genética de populações, refere-se à distribuição não aleatória dos alelos e genótipos no espaço e/ou no tempo

resultante da ação de forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população (HAMRICK, 1982). De acordo com revisão feita por ZUCCHI (2002), a caracterização da estrutura genética entre populações através de marcadores codominantes pode ser abordada de três maneiras: estatísticas F (WRIGHT, 1951), análise de diversidade gênica em populações subdivididas (NEI, 1977) e coeficientes de coancestralidade (COCKERHAM, 1969; LOISELLE et al., 1995).

A mais antiga e mais usada medida de diferenciação genética são as estatísticas F (FREELAND, 2005; ALLENDORF & LUIKART 2007). Estas descrevem a distribuição da variação genética através de coeficientes de endogamia, os quais equivalem à redução na heterozigosidade esperada com acasalamento ao acaso em qualquer nível hierárquico populacional com relação a outro nível mais inclusivo (HARTL & CLARK, 1997). As estatísticas F podem ser calculadas em três níveis diferentes: FIS, FST E FIT (WRIGHT, 1951). As letras utilizadas nas siglas definem os níveis em que a endogamia é calculada e se referem a indivíduo (I), subpopulação (S) e população total (T). Assim, FIS mede o grau de endogamia dentro de indivíduos com relação ao restante da sua população, refletindo a probabilidade de dois alelos quaisquer no mesmo indivíduo serem idênticos por descendência (WRIGHT, 1951). FST, segundo este autor, fornece estimativa da diferenciação genética entre populações, sendo a medida do grau de endogamia dentro da população com relação ao conjunto total de populações. Por último, FIT fornece o coeficiente de endogamia geral para o indivíduo através da medição da heterozigosidade de um indivíduo com relação ao conjunto total das populações.

FST foi o método original para a estimativa de diferenciação entre populações a partir de frequências alélicas e, desde então, diversas variações foram desenvolvidas (FREELAND, 2005). De acordo com revisão feita por NEIGEL (2002), existem várias definições de FST que diferem da de WRIGHT (1951), como: GST (NEI, 1973), θ (WEIR & COCKERHAM, 1984), NST (LYNCH & CREASE, 1990), e RST (SLATKIN, 1995). A estatística GST desenvolvida por NEI (1973) é equivalente a FST quando existem apenas dois alelos em um loco, sendo, no caso da existência de múltiplos alelos, equivalente à média ponderada de FST para todos os alelos. A estatística θ (WEIR & COCKERHAM, 1984) leva em consideração os efeitos de tamanhos amostrais diferentes e o número de populações amostradas. A estatística RST (SLATKIN, 1995), por sua vez, foi

desenvolvida para a análise de dados baseados em microssatélites, assumindo o modelo de “passos de mutação”.

O parâmetro F_{ST} ou demais estatísticas correlatas permitem estimar, de maneira indireta, níveis de fluxo gênico que ocorreram no passado para produzir os padrões observados de divergência genética entre populações (SLATKIN, 1987). Este método calcula o número de migrantes por geração (Nm) para um conjunto de populações e assume o modelo de ilhas, o qual pressupõe ausência de seleção ou mutação, número infinito de populações com mesmo tamanho e mesma probabilidade de troca de migrantes, além de assumir que as populações estão em equilíbrio de migração e deriva (FREELAND, 2005). Apesar desta estatística se basear em modelo irrealista, dados empíricos e de simulações indicam que este método é robusto (BROQUET & PETIT, 2009).

A estrutura genética espacial pode ser, ainda, estudada através de estatísticas que descrevem a distribuição espacial dos indivíduos amostrados da população (KAGEYAMA et al., 1998). Entre as análises mais comuns deste tipo, estão o índice I de Moran, que quantifica a similaridade genética entre pares de indivíduos espacialmente adjacentes com relação a toda amostra populacional, e coeficientes de parentesco ou coeficientes de coancestralidade, os quais estimam a probabilidade de dois alelos amostrados de maneira aleatória serem idênticos por descendência (LOISELLE et al., 1995; KAGEYAMA et al., 1998; LYNCH & WALSH, 1998).

2.5. MARCADORES MOLECULARES E MARCADORES MICROSSATÉLITES

Marcadores genéticos podem ser classificados em: morfológicos, aqueles baseados em caracteres visuais ou agrônômicos; bioquímicos, baseados em produtos gênicos; e moleculares, baseados no acesso ao DNA (SEMAGN et al., 2006). Os marcadores moleculares são definidos por estes autores como sequências identificáveis de DNA, encontradas em localizações específicas do genoma, transmitidas pelas leis comuns de herança de uma geração para a outra. Permitem análises rápidas através do acesso direto ao genótipo do indivíduo, eliminando a influência do ambiente nos resultados (MILLACH, 1999; SOLÉ-CAVA, 2001). De acordo com SEMAGN et al. (2006), não devem ser

considerados como genes normais, visto que usualmente não possuem efeito biológico, mas sim como constantes pontos de referência no genoma.

Marcadores moleculares têm muitas aplicações como: medir a variabilidade genética em populações, estimar taxas de migração e fluxo gênico, caracterizar o sistema reprodutivo, analisar o parentesco, analisar a eficiência de bancos de germoplasma, no *fingerprinting* e verificação do DNA, no controle de qualidade no melhoramento, em estudos de filogenia e taxonomia molecular, em mapeamentos genéticos, em seleção assistida por marcadores, entre outros (GLAUBITZ & MORAN, 2000). Cada marcador apresenta características próprias e o tipo de marcador a ser utilizado depende dos objetivos da pesquisa a ser desenvolvida (FERREIRA et al., 2007). Caso o estudo se trate da análise de diversidade genética interespecífica, regiões mais conservadas do genoma devem ser amostradas; caso se trate da análise de diversidade entre indivíduos da mesma espécie, regiões mais variáveis do genoma devem ser amostradas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Estes marcadores são classificados em diferentes grupos com base no modo de transmissão (herança nuclear biparental, nuclear maternal, organelar maternal ou organelar paternal); modo de ação gênica (marcadores dominantes ou codominantes); e método de análise (marcadores baseados em hibridização ou em amplificação do DNA) (SEMAGN et al., 2006). Os métodos mais importantes para acessar padrões de variação genética são baseados na amplificação de DNA, a qual é feita através da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (FINKELDEY & HATTEMER, 2007). A PCR, ou reação em cadeia através da polimerase, tem a função de amplificar fragmentos específicos do DNA, o que ocorre através de três passos básicos: desnaturação da fita dupla do DNA, anelamento de um par de *primers* à região a ser amplificada e amplificação através da enzima polimerase de DNA resistente ao calor chamada “Taq polimerase” (SEMAGN et al., 2006; WHITE et al., 2007). Entre os marcadores que utilizam a amplificação de DNA estão os marcadores microssatélites.

Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são regiões do DNA compostas de pequenos motivos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem (TÓTH et al., 2000). A técnica de microssatélites revela polimorfismo em determinado loco devido a diferenças no número de vezes em que estas repetições de sequência simples ocorrem (FERREIRA et al., 2007). A amplificação de SSR via PCR é realizada através de *primers* específicos que

flanqueiam os microssatélites, sendo necessário primeiramente desenvolver tais *primers* para a espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007). De acordo com KALIA et al. (2011), o desenvolvimento de SSR é tradicionalmente feito por isolamento de bibliotecas genômicas da espécie de interesse. Contudo, mais recentemente algumas estratégias alternativas foram desenvolvidas para diminuir o tempo e aumentar a capacidade de desenvolvimento de SSR, como identificação de sequências SSR em RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), *screening* de sequências EST (*Expressed Sequence Tags*) disponíveis em bases de dados e transferabilidade de marcadores de espécies relacionadas.

Marcadores SSR apresentam muitos aspectos positivos: herança co-dominante; transferabilidade; alto grau de polimorfismo mesmo entre linhagens próximas; cobertura genômica extensa e bem distribuída; a análise de polimorfismos de SSR é mais simples e econômica quando comparada a outras metodologias, além de demandar pequena quantidade de DNA, poder ser automatizada e permitir uso de técnicas de fluorescência e *multiplex* (MILLACH, 1999; TÓTH et al., 2000; SEMAGN et al., 2006; GRATTAPAGLIA, 2007; KALIA et al., 2011). Devido a estas características, estes marcadores obtiveram considerável importância em genética de plantas e melhoramento e são a escolha atual em grande parte das áreas de genética molecular, sendo considerados excelentes para estudos de genética de populações (OLIVEIRA et al., 2006; SEMAGN et al., 2006; KALIA et al., 2011).

Marcadores SSR têm sido classificados variavelmente de acordo com seu tamanho, localização no genoma e tipo de unidade de repetição (KALIA et al., 2011). De acordo com estes autores, dependendo do número de nucleotídeos por unidade de repetição, o SSR pode ser mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídico; segundo a localização no genoma, pode ser nuclear, cloroplastidial ou mitocondrial; quanto ao tipo de unidade de repetição, pode ser perfeito, imperfeito, interrompido ou composto. Em SSRs perfeitos a sequência repetida não é interrompida por nenhuma base não pertencente ao motivo; em SSRs imperfeitos existe ao menos um par de bases não pertencente à sequência do motivo entre as repetições dos motivos; em SSRs interrompidos existe uma pequena sequência diferente da sequência do motivo entre as repetições; em SSRs compostos, por sua vez, a sequência contém duas sequências repetitivas distintas adjacentes (WEBER, 1990; WANG et al., 2009; JANE & LAGODA, 1996).

A taxa de mutação nos marcadores SSR é, em geral, de 10 a 100 vezes maior do que em outras regiões do genoma, fazendo com que sejam consideradas sequências de alta taxa evolutiva (FERREIRA et al., 2007). A evolução destes tipos de marcadores, a qual se refere a qualquer aumento ou diminuição no número de repetições, possui dinâmica excessivamente complexa (KALIA et al., 2011). Segundo OLIVEIRA et al. (2006), existem quatro modelos de mutação que podem ser utilizados para dados de microssatélites, porém todos possuem desvantagens quando aplicados a estes marcadores, sendo eles: modelo de ‘alelos infinitos’ (IAM, *Infinite Alleles Model*), modelo de passos de mutação (SMM, *Stepwise Mutation Model*), modelo de duas fases (TPM, *Two Fase Model*) e modelo de k-alelos (KAM, *K-Alleles Model*).

No modelo IAM (KIMURA & CROW, 1964), qualquer alelo pode mutar para qualquer outro alelo, fazendo com que proximidade em termos de número de repetições em locos microssatélites não indiquem proximidade genética, sendo este o modelo utilizado por WRIGHT (1951) nas estatísticas F. Isto não ocorre no modelo SMM (OHTA & KIMURA, 1973), em que a mutação ocorre através do ganho ou perda de apenas uma unidade repetitiva, no caso de SSR, sendo este o modelo utilizado na estatística RST de SLATKIN (1995). O modelo TPM (DI RIENZO et al., 1994) é extensão do modelo SMM para estudos com SSR, em que a maior parte dos eventos de mutação resulta em aumento ou diminuição de uma unidade de repetição, apesar de poder ocorrer também alterações de número grande de repetições. Por último, o modelo KAM (CROW & KIMURA, 1970), assume que, na existência de exatamente k alelos possíveis em determinado loco, a probabilidade de um alelo sofrer mutação e se tornar outro alelo é $\mu / k-1$, sendo μ a taxa de mutação.

2.6. ESPÉCIES ALVO

2.6.1. Jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne)

O Jatobá-do-Cerrado é espécie arbórea da família Fabaceae (Leguminosae – Caesalpinioideae), nativa do Cerrado e que pode alcançar até 20 m de altura e 50 cm de DAP (diâmetro a altura do peito) (LEE & LANGENHEIM, 1975; CARVALHO, 2006) (Figura 2.1). Possui tronco de cor acinzentada com fissuras sinuosas e descontínuas; folhas compostas, bifolioladas, alternas, espiraladas com folíolos ovados a largo-elípticos de até 25 cm de comprimento e 7 cm de largura, coriáceos, concolores e pilosos em ambas faces

(SILVA-JÚNIOR, 2005). Suas flores são brancas, possuem 5 pétalas livres e apresentam até 5 cm de diâmetro; seus frutos são lenhosos e cilíndricos, de cor castanho-avermelhada quando maduros, apresentando até 12 cm de comprimento; as sementes são esferóides, globóides ou achatadas, de cor castanho-avermelhada, apresentando até 2,5 cm de diâmetro (SILVA-JÚNIOR, 2005).



Figura 2.1. Imagens de *H. stigonocarpa*. A. Árvore. B. Flor. C. Fruto e sementes. D. Tronco. E. Folhas. Fonte: Fernando Tatagiba.

H. stigonocarpa é considerada vicariante de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Y. T. Lee & Langenh. pois ambas são proximamente relacionadas, ocorrem em áreas adjacentes, porém são ecologicamente distintas (HERINGER et al. 1976). RIZZINI (1997) considera que o material de herbário de *H. stigonocarpa* e *H. courbaril* var. *stilbocarpa* possui apenas pequenas diferenças, apesar destas serem distintas na natureza devido a diferenças no porte e em aspectos observados no tronco. Isto está de acordo com RAMOS et al. (2009), que observaram que *H. stigonocarpa* e *H. courbaril* var. *stilbocarpa* compartilham haplótipos e possuem suficiente similaridade genética para sugerir a existência de polimorfismo ancestral e/ou hibridização, o que indica que a classificação taxonômica atual necessita de revisão.

De acordo com LEE & LANGENHEIM (1975), são conhecidas três variedades de *H. stigonocarpa*: *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* Mart., *Hymenaea stigonocarpa* var. *brevipetiolata* N. F. Mattos e *Hymenaea stigonocarpa* var. *pubescens* Benth. Porém, como ressaltado por MORENO (2009), podem ser observadas grandes variações morfológicas entre indivíduos dentro da mesma população e até entre folhas de um mesmo indivíduo, parecendo, assim, que a variação intra-específica não é demarcada de maneira adequada para as três variedades.

O Jatobá-do-Cerrado ocorre na Bolívia, Paraguai e nas seguintes regiões e estados brasileiros: Sudeste (MG, SP), Centro-Oeste (DF, MT, MS, GO), Nordeste (BA, CE, MA, PE, PI, RN), Norte (AM, PA, TO), apresentando, assim, ampla abrangência (LEE & LANGENHEIM, 1975; ALMEIDA et al., 1998; SILVA-JÚNIOR, 2005; CARVALHO, 2006). No Cerrado, ocorre nas fitofisionomias campo sujo, campo Cerrado, Cerrado sentido restrito e cerradão (SILVA-JÚNIOR, 2005), podendo apresentar densidades de 2 a 43 indivíduos por hectare para este Domínio Fitogeográfico (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2006) e de 3 a 6 indivíduos por hectare em Cerrado sentido restrito do Distrito Federal (SILVA-JÚNIOR, 2005). Esta espécie ocorre naturalmente em solos de fertilidade química baixa e terrenos bem drenados, é considerada heliófila e não tolera baixas temperaturas (CARVALHO, 2006).

H. stigonocarpa apresenta madeira densa, dura e resistente, considerada de excelente qualidade e é muito apreciada na construção civil e naval, sendo empregada em cercas, esteios e postes, além de oferecer lenha e carvão de qualidade (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2006). Sua casca produz resina para vernizes e corantes, além de ser utilizada na medicina popular para inflamações da bexiga e próstata, para o estômago, coqueluche, como depurativo, contra queimadura e tosse (SILVA-JÚNIOR, 2005; CARVALHO, 2006). A resina extraída do tronco é tida como afrodisíaca e tônica e também é usada na medicina popular (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2006). A polpa do fruto é utilizada na medicina popular como laxante, além de ser usada na alimentação humana, sendo consumida *in natura*, em forma de geleia, licor, farinha para bolos, pães e mingaus (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2006).

O Jatobá-do-Cerrado é ornamental e pode ser utilizado na arborização urbana em geral (CARVALHO, 2006). É recomendado, ainda, para recuperação de áreas degradadas do Cerrado em condições de solo bem drenado (DURIGAN, 2003). Produz anualmente

grande quantidade de frutos que servem de alimento para a fauna (MORAES et al., 2007), sendo esta uma importante característica ecológica da espécie para sua utilização em recuperação de áreas degradadas.

Apesar das suas importâncias econômica e ecológica, esta espécie foi muito explorada no passado pela indústria naval devido à qualidade da sua madeira quanto à durabilidade e resistência ao apodrecimento (MORAES et al., 2007). Somando a isso sua baixa densidade natural e a destruição generalizada dos seus habitats, segundo estes autores, a espécie é encontrada principalmente em pequenas populações remanescentes ou como árvores isoladas em campos e pastagens.

A floração e frutificação desta espécie ocorrem em diferentes períodos de acordo com a localização geográfica (CARVALHO, 2006). De maneira geral, porém, a floração ocorre de outubro a abril e a frutificação de abril a julho (ALMEIDA et al., 1998; SILVA-JÚNIOR, 2005). A folheação, de acordo com SILVA-JÚNIOR (2005) ocorre de julho a setembro. Os principais vetores de polinização da espécie são os morcegos, tendo sido observado por GIBBS et al., (1999) que apesar de mariposas visitarem as flores das árvores, apenas morcegos entram em contato de fato com anteras e estigmas. A dispersão dos frutos e sementes de Jatobá-do-Cerrado é zoocórica, sendo realizada por mamíferos (SILVA-JÚNIOR, 2005).

De acordo com GIBBS et al. (1999) e CARVALHO (2006), *H. stigonocarpa* é diplóide, monóica, com flores hermafroditas, e é basicamente alógama. GIBBS et al. (1999) observou controle pós-zigótico de autopolinização nesta espécie, ocorrendo abscisão da maioria das flores autopolinizadas dentro de 7 a 8 dias, tendo algumas, porém, se desenvolvido normalmente em frutos. A possibilidade de ocorrência de autopolinização nesta espécie é corroborada por MORAES et al. (2007), que observaram taxas de autofecundação (1 – taxa de cruzamento multiloco) entre 0,127 a 0,143 em populações fragmentadas e árvores isoladas de *H. stigonocarpa*, respectivamente, e por MORAES & SEBBENN (2011), que observaram 12% e 26% de autopolinização em árvores não isoladas e isoladas, respectivamente. Além disso, de acordo com constatação de LEWINSOHN (1980), a espécie pode também se reproduzir vegetativamente, apresentando raízes gemíferas que facilitam este tipo de reprodução, que pode propiciar a formação de agrupamentos com vários indivíduos ligados subterraneamente.

Diferentes estudos abordando genética de populações de *H. stigonocarpa* foram realizados. RAMOS et al. (2007) estudaram a filogeografia da espécie através de genes *psbC* e *trnS*. MORAES et al. (2007) avaliaram o sistema de reprodução em populações fragmentadas e em árvores isoladas de *H. stigonocarpa*, através de marcadores SSR. CIAMPI et al. (2008) desenvolveram marcadores SSR para *H. courbaril* e os transferiram para *H. stigonocarpa*. DEFAVARI et al. (2009) e MORENO et al. (2009) avaliaram a estrutura genética espacial de populações da espécie através de marcadores alozímicos e marcadores microssatélites cloroplastidiais, respectivamente. MORAES & SEBBENN (2011) estudaram a dispersão de pólen entre árvores isoladas no Cerrado através de marcadores SSR.

2.6.2. Baru (*Dipteryx alata* Vogel.)

Baru é espécie arbórea da família Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae), nativa do Cerrado e que pode alcançar até 20 m de altura e 70 cm de DAP (diâmetro a altura do peito) (CARVALHO, 2003) (Figura 2.2). Possui tronco com ritidoma de cor amarelada com estrias transversais e depressões; folhas compostas imparipinadas, alternadas, espiraladas, com pecíolos e raque alados, com 7 a 13 folíolos alternos, oblongos, de até 10 cm de comprimento e 5 cm de largura, coriáceos, descolores, com glândulas translúcidas pequenas e glabros (SILVA-JÚNIOR, 2005). Suas flores são de cor creme com cinco pétalas, sendo duas pétalas fundidas no vexilo ou estandarte, que tem mancha rosa ou roxa, apresentando até 0,8 cm de diâmetro; seus frutos são carnosos, ovoides a esferóides, de cor creme e até 6 cm de comprimento; as sementes ocorrem uma por fruto, são elipsoides, de cor castanha e apresentam até 3 cm de comprimento (SILVA-JÚNIOR, 2005).

O gênero *Dipteryx* Schreb. possui 12 espécies nas Américas do Sul e Central, sendo que a maioria destas espécies ocorrem na região amazônica, duas ocorrem no Panamá e Honduras e apenas uma espécie, *D. alata*, ocorre em zonas com duas estações nitidamente marcadas (seca e chuvosa), no Cerrado (RIZZINI, 1963; LEWIS et al., 2005). *D. alata* é considerada espécie vicariante de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., conhecida popularmente como Cumaru, a qual ocorre na Floresta Amazônica, e na Mata Atlântica, nos estados AC, AM, PA, RO, MA, PE, MT, MS e GO (CARVALHO, 2003; CARVALHO, 2009).

O Baru ocorre na Bolívia, Colômbia, Paraguai e nas seguintes regiões e estados brasileiros: Sudeste (SP, MG), Centro-Oeste (GO, MT, MS, DF), Nordeste (MA, PI, BA), Norte (PA, TO, AM), apresentando, assim, distribuição ampla no Brasil (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; POTT & POTT, 2003; SANO et al., 2004; SILVA-JÚNIOR, 2005). Apresenta distribuição irregular, podendo ocorrer em grandes agrupamentos homogêneos (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004). Ocorre no Cerrado sentido restrito, cerradão mesotrófico, matas secas e no Pantanal Mato-Grossense (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; POTT & POTT, 2003; SILVA-JÚNIOR, 2005). Em geral a espécie é considerada heliófila e ocorre naturalmente em solos de fertilidade química média, bem drenados, tendo preferência por solos areno-argilosos (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004).

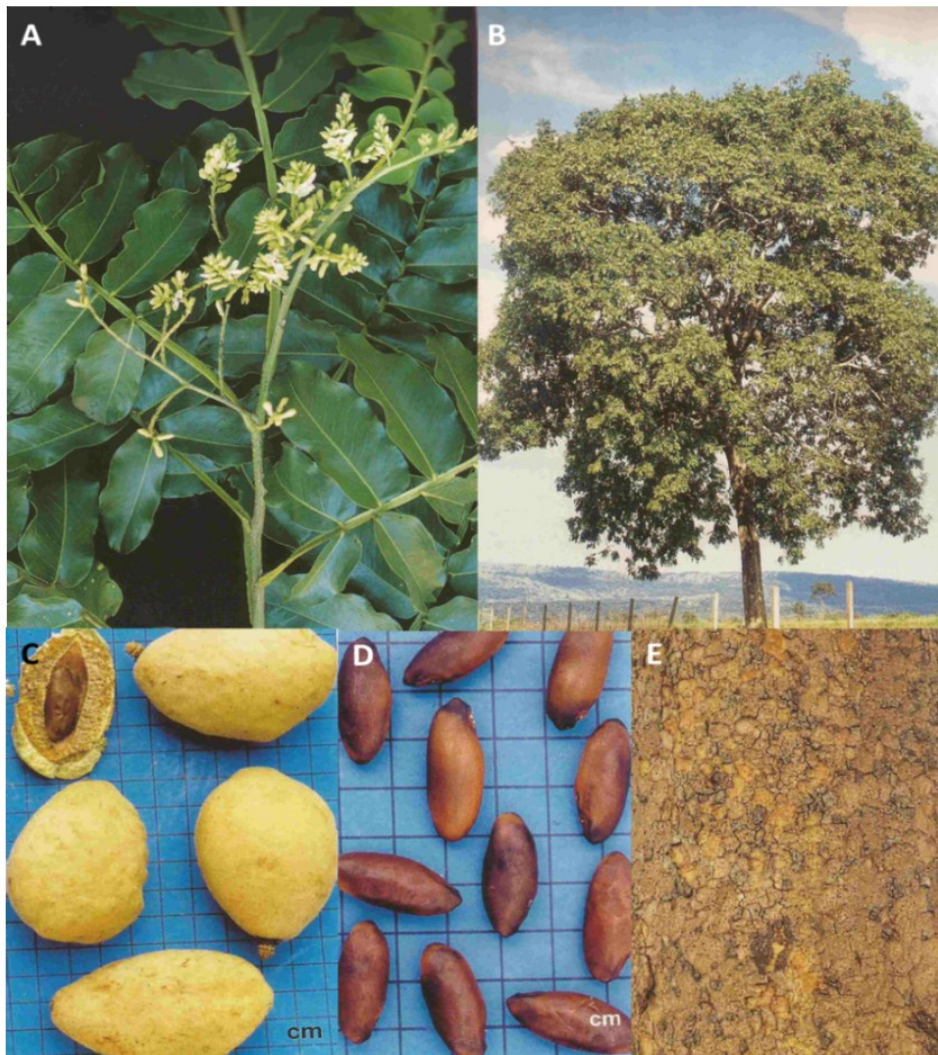


Figura 2.2. Imagens de *D. alata*. A. Folhas e inflorescências. B. Árvore C. Fruto. D. Sementes. E. Tronco. Fonte: LORENZI (2002).

Apresenta madeira de densa a muito densa, com alta resistência ao ataque de organismos xilófagos, com vida média quando em contato com o solo inferior a 9 anos, sendo indicada para obras hidráulicas, construção de estruturas, construção naval, construção civil e implementos agrícolas, além de fornecer lenha de qualidade e poder ser empregada na fabricação de papéis (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003). A polpa do fruto e a sementes são bastante nutritivas, possuem alto teor proteico e conteúdo de potássio e são utilizadas na alimentação, sendo que a semente possui sabor semelhante ao amendoim (ALMEIDA et al., 1998). A amêndoa (semente) pode ser consumida *in natura*, torrada, como pé-de-moleque, paçoquinha, em rapadura, barra de cereais, bolo, licor, panetone e bombom (CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004; SILVA-JÚNIOR, 2005). A polpa pode ser, ainda, utilizada na alimentação animal ou como fertilizante (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004). O óleo da amêndoa é medicinal: é utilizado como anti-reumático, possui propriedades sudoríferas, tônicas e reguladoras da menstruação, além de ser utilizado como aromatizante em tabacaria (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004; SILVA-JÚNIOR, 2005).

O Baru é utilizado ainda como planta ornamental, no paisagismo e arborização urbana, apresentando bom crescimento, baixa exigência de adubação e de manutenção (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004). É recomendado para uso em recuperação de áreas degradadas, apresentando alta produção de massa foliar, que favorece o enriquecimento de nutrientes no solo, sendo espécie chave na sustentação da fauna silvestre devido a seus frutos serem um dos poucos que apresentam polpa carnosa durante a estação seca no Cerrado, alimentando pássaros, morcegos, roedores, macacos e insetos (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004). Apesar da sua importância econômica e ecológica, grandes populações desta espécie foram destruídas e continuam sendo desperdiçadas em ecossistemas nativos (POTT & POTT, 2003).

A floração e frutificação desta espécie ocorrem em diferentes períodos de acordo com a localização geográfica (CARVALHO, 2003). De maneira geral, porém, a floração ocorre de novembro a fevereiro e a frutificação, de janeiro a março (ALMEIDA et al., 1998; SILVA-JÚNIOR, 2005). A folheação, de acordo com SILVA-JÚNIOR (2005) ocorre de julho a setembro. A dispersão de frutos e sementes é barocórica e zoocórica, sendo realizada principalmente por morcegos e macacos (CARVALHO, 2003). De acordo com FERREIRA (1980), porém, os macacos chegam a atrapalhar a dispersão pois

conseguem quebrar o fruto com pedra e comer as sementes, sendo, de acordo com SANO et al., (2004), mais predadores do que dispersores. Os morcegos levam os frutos das árvores para pouso de alimentação, geralmente em outros locais onde os deixam cair, podendo ser inclusive outras árvores; além dos morcegos, os bovinos ingerem o fruto inteiro e eliminam o endocarpo com a semente (SANO et al., 2004).

D. alata é diplóide, hermafrodita e alógama, apresentando, de acordo com OLIVEIRA & SIGRIST (2008), auto-incompatibilidade de ação tardia e elevada taxa de aborto. TARAZI et al. (2010), contudo, com base em análise de paternidade e SSR, observaram que de 300 sementes analisadas da espécie, 51 teriam sido originadas por autopolinização. Estes autores sugerem que a baixa densidade das árvores estudadas pode ter reduzido a taxa de cruzamento devido à baixa efetividade dos polinizadores. Estudos indicam que os principais polinizadores de *D. alata* são espécies de abelhas. THUM & COSTA (1998/1999) observaram visitação às flores de *D. alata* por insetos das ordens Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera, sendo que 50,4% dos insetos coletados foram indivíduos de *Apis mellifera* (Apidae). Isso é corroborado por DAMASCENO (1998), que observou visitação às flores de Baru por várias espécies de abelhas, principalmente das famílias Apidae e Andrenidae. Segundo OLIVEIRA & SIGRIST (2008), apesar de ocorrer visitação de vespas, borboletas, moscas e beija-flores às flores de Baru, *Xylocopa suspecta* (Apidae) é o principal polinizador, pois visita legitimamente as flores e apresenta forrageamento que promove fluxo de pólen entre os indivíduos.

Diferentes estudos abordando genética de populações de *D. alata* foram realizados. SOARES et al. (2008) avaliaram a distribuição espacial da variabilidade genética intrapopulacional da espécie através de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). SOARES et al. (2008b) estudaram padrões espaciais de divergência genética entre populações de *D. alata* com uso de RAPD. TARAZI et al. (2010) avaliaram a estrutura genética e sistema reprodutivo de populações da espécie através de SSR. MELO et al. (2011) analisaram a variabilidade genética de indivíduos da espécie em populações naturais e em bancos de germoplasma com uso de SSR. DINIZ-FILHO et al. (2012) analisaram o impacto de futuras mudanç as climáticas em populações naturais da espécie através de SSR. SOARES et al. (2012) desenvolveram marcadores SSR para *D. alata*.

2.7. CENTRO DE REFERÊNCIA EM CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS (CRAD)

Os plantios de recuperação de áreas degradadas estudados foram implantados pelo Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas - Universidade de Brasília (CRAD/UnB). Este centro possui caráter multidisciplinar e visa promover e divulgar estudos, pesquisas e atividades de extensão em conservação da natureza e recuperação de áreas degradadas; desenvolver modelos demonstrativos de recuperação; incentivar o aprimoramento científico de profissionais das referidas áreas e subsidiá-los para atividades de extensão e educação ambiental; contribuir para a pesquisa e aperfeiçoamento do ensino em todos os níveis com relação às referidas áreas de conhecimento; promover o aperfeiçoamento científico de seus membros; e desenvolver pesquisas, consultorias, prestação de serviços, de âmbito nacional e internacional, nas áreas de sua atuação (CRAD, 2013).

Entre as atividades desenvolvidas pelo CRAD estão: pesquisas para a produção de mudas de espécies nativas do Cerrado e instalação de viveiros florestais; estudos de avaliação da fauna e flora no Cerrado; desenvolvimento de projetos de recuperação de áreas degradadas através de Módulos Demonstrativos de Recuperação de áreas degradadas com uso de espécies nativas do Cerrado; e oferta de cursos de capacitação e educação ambiental (Figura 2.3) (CRAD, 2013). Entre os projetos de recuperação de áreas degradadas está o Programa de Revitalização na Bacia do São Francisco, dentro do qual o CRAD/UnB é especificamente responsável por atuar no trecho Médio São Francisco, no Cerrado. Através deste projeto foram implementados, de 2007 a 2011, plantios de recuperação em 28 áreas (Figura 2.3 C), totalizando cerca de 38.000 mudas, distribuídas em mais de 120 espécies nativas do Cerrado. Estes plantios foram realizados com recursos repassados ao CRAD/UnB pela Secretaria de Recursos Hídricos e Ambiente Urbano - SRHU, do Ministério do Meio Ambiente - MMA.

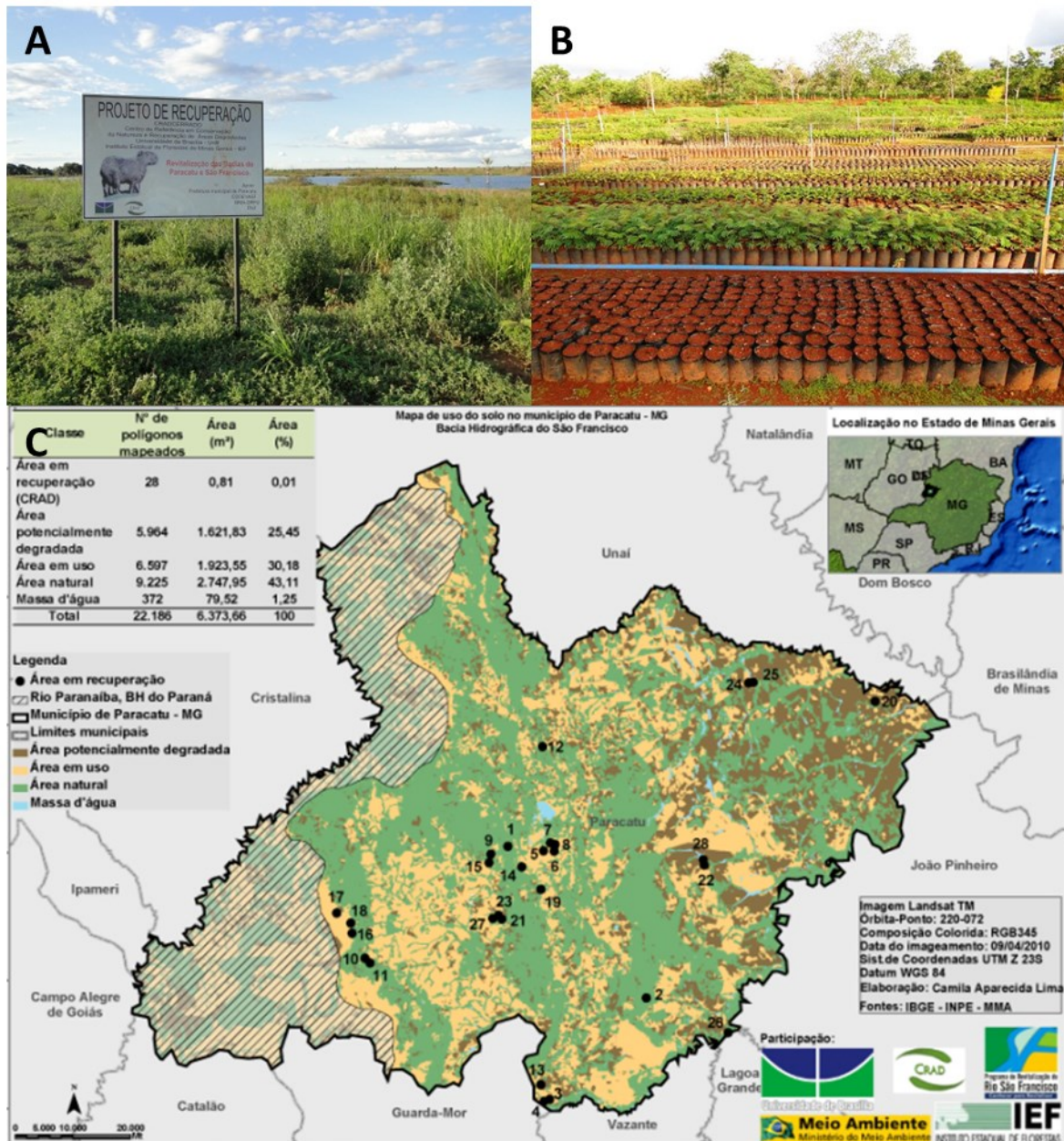


Figura 2.3. Ações realizadas pelo Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas - Universidade de Brasília (CRAD/UnB). A. Plantio de recuperação em área degradada como ação de revitalização da Bacia do São Francisco, em Paracatu – MG. B. Produção de mudas de espécies nativas do Cerrado. C. Mapa de uso do solo no município de Paracatu – MG, indicando a localização das 28 áreas em recuperação, através das ações do CRAD/UnB.

3. VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne EM ÁREAS NATIVAS E EM PLANTIOS DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS EM PARACATU, MG

3.1. INTRODUÇÃO

Recentemente, ações de recuperação de áreas degradadas passaram a considerar, além de questões como a alta diversidade de espécies nativas e a escolha de espécies de uso múltiplo, a necessidade de existência de auto-sustentabilidade em longo prazo nos plantios de recuperação (BRANCALION et al, 2009; RODRIGUES et al., 2009). Entretanto, apesar da crescente importância da ecologia da restauração, esta é uma ciência relativamente nova, existindo poucos critérios para a implantação de populações geneticamente auto-sustentáveis (HUFFORD & MAZER, 2003). O critério mais importante nesse sentido é o nível de variabilidade genética necessário para assegurar o sucesso em longo prazo das populações em plantios de recuperação, cuja definição, entretanto, é complexa e pode variar tanto quanto espécies e populações naturais variam (MCKAY et al., 2005).

Uma das estratégias de avaliação da viabilidade genética de populações introduzidas em plantios de recuperação é compará-las com populações-fonte, de onde foram coletados os propágulos para sua implantação, ou com populações-referência, possibilitando definir se as populações restauradas mantêm níveis similares de diversidade genética em relação a populações-fonte ou populações-referência (RAMP et al., 2006). De acordo com estes autores, apesar de dados de genética de populações fornecerem informações críticas para o sucesso de projetos de recuperação de áreas degradadas, apenas recentemente ferramentas genético-moleculares começaram a ser utilizadas com esta finalidade.

Entre as espécies nativas do Cerrado utilizadas na recuperação de áreas degradadas está o Jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). Esta espécie é diplóide, possui flores hermafroditas e é basicamente alógama (GIBBS et al., 1999; CARVALHO, 2006), podendo apresentar, contudo, autopolinização em situações envolvendo isolamento dos indivíduos (MORAES et al., 2007; MORAES & SEBBENN,

2011). *H. stigonocarpa* apresenta importância econômica devido, principalmente, à sua madeira, a qual apresenta boa durabilidade e resistência ao apodrecimento (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2006). Por conta disso, foi sobre-explorada no passado e hoje é encontrada principalmente em pequenas populações remanescentes ou como árvores isoladas em campos e pastagens (MORAES et al., 2007). No entanto, a espécie possui características ecológicas favoráveis à recuperação de áreas degradadas, como a produção de grande quantidade de frutos atraentes à fauna (MORAES et al., 2007). Por ser espécie de uso múltiplo, FELFILI et al. (2006) recomendam seu uso em plantios de recuperação de áreas degradadas no Cerrado por meio do modelo Nativas do Bioma. Seu uso em projetos de recuperação é indicado, ainda, por DURIGAN (2003), para plantios de recuperação em áreas no Cerrado com solo bem drenado.

Assim, este capítulo tem como objetivo analisar a variabilidade genética de populações de *H. stigonocarpa* em plantios de recuperação de áreas degradadas e em áreas nativas de Cerrado sentido restrito, amostradas em Paracatu - MG, comparando-as, no sentido de avaliar se as populações em plantios de recuperação são geneticamente auto-sustentáveis.

Os objetivos específicos foram:

- Quantificar e analisar a variabilidade genética de populações de *H. stigonocarpa* em quatro plantios de recuperação de áreas degradadas e duas áreas nativas de Cerrado sentido restrito, no município de Paracatu – MG, visando avaliar a viabilidade genética destas populações em plantios de recuperação;
- Analisar a distribuição espacial dos genótipos de populações de *H. stigonocarpa* em duas áreas nativas de Cerrado sentido restrito, no município de Paracatu – MG, visando elaborar recomendações técnicas para a coleta de sementes nestas populações de maneira a assegurar a existência de variabilidade genética nas sementes a serem utilizadas em plantios de recuperação de áreas degradadas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Áreas de estudo

Foram analisadas quatro áreas de plantios de recuperação de áreas degradadas (P1, P2, P5 e P6) e duas áreas nativas de Cerrado sentido restrito (N1 e N2), todas localizadas próximas ao município de Paracatu, MG. Em cada área foi amostrada uma população de *H. stigonocarpa*. Neste caso foi adotada a definição estatística de população de SOKAL & ROHLF (1969), segundo os quais população se refere ao conjunto de indivíduos que existe dentro de determinada área de amostragem, limitada em espaço e tempo, sobre os quais são feitas inferências estatísticas.

Os plantios de recuperação de áreas degradadas foram implantados pelo Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas - CRAD/UnB, com o objetivo de contribuir para a revitalização na Bacia do São Francisco, trecho Médio São Francisco no Cerrado. Informações adicionais sobre o CRAD podem ser conferidas no item 2.7. Os plantios selecionados (Figura 3.1) foram realizados em diferentes épocas, visto que o material genético utilizado em cada período de plantio foi diferente (Tabela 3.1), devido às coletas de sementes serem feitas de maneira aleatória. As áreas nativas, por sua vez, se localizam em regiões distintas, próximas aos locais dos plantios, onde comumente são coletadas as sementes para produção das mudas utilizadas nos plantios de recuperação (Figura 3.1).

O município de Paracatu está localizado na porção noroeste do estado de Minas Gerais, entre as coordenadas 17°36' de latitude Sul e 46°42' de longitude Oeste, com altitude de 550 metros, sendo o clima da região, segundo a classificação de Köppen, do tipo Aw, clima tropical úmido de savana, com inverno seco e verão chuvoso (BRASIL, 1992; BRASIL, 1996). A temperatura média anual é de 22,6° C, com média mensal de 18° C na estação mais fria e 29,1° C na mais quente, e precipitação média anual de 1.450 mm, com precipitações médias mensais inferiores a 60 mm nos meses mais secos (BRASIL, 1992; BRASIL, 1996).

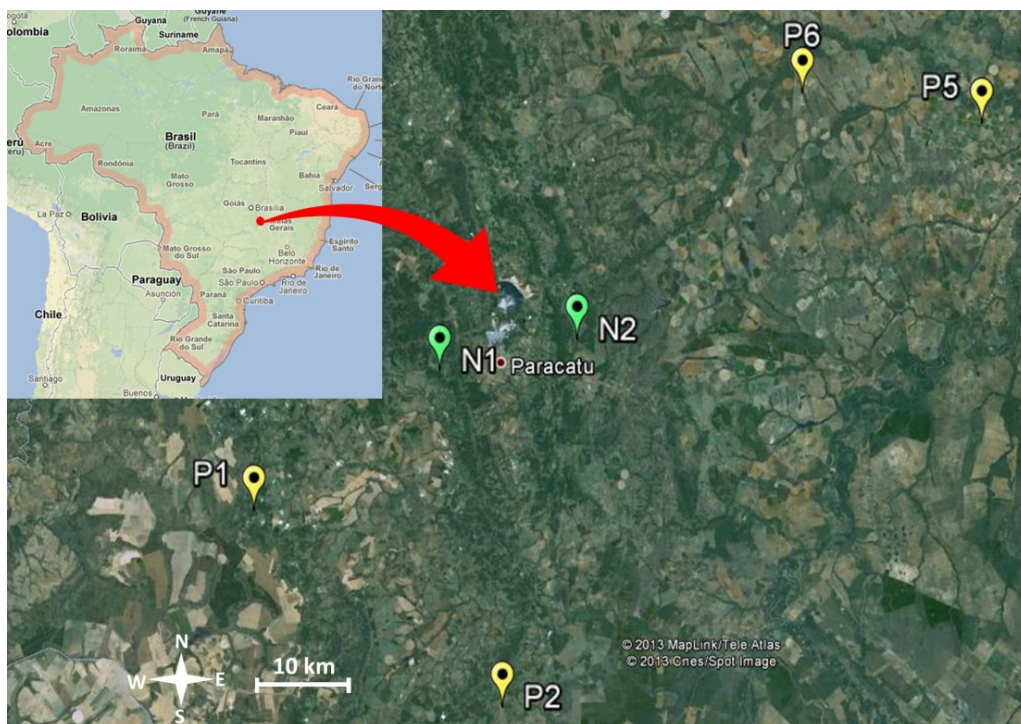


Figura 3.1. Localização do município de Paracatu, MG, dos plantios de recuperação de áreas degradadas (P1, P2, P5 e P6) e das áreas nativas de Cerrado sentido restrito (N1 e N2). Fonte: Google Maps (A e B) e Google Earth (C).

Tabela 3.1. Características das áreas de plantios, em processo de recuperação, localizadas próximas ao município de Paracatu - MG.

Propriedade rural	Coordenadas	Distância de Paracatu	Área em recuperação	Condição ambiental	Época de plantio	Número de espécies plantadas
Cascalheira Márcia Sanders (P1)	17°22'21"S e 46°69'34"W	33,1 km	4,5 ha	Área de exploração de cascalho	Fev./2009	62
Fazenda Riacho (P2)	17°34'23,5"S e 46°52'26,4"W	35,2 km	8,0 ha	Pastagem em área de nascente	Dez./2009	54
Fazenda Brizola (P5)	16°58'40,81"S e 46°19'21,48"W	66,6 km	7,5 ha	Pastagem	Jan./2011	30
Fazenda Chimarrão (P6)	16°56'50,21"S e 46°31'44,13"W	50,7 km	6,0 ha	Área de interflúvio (entorno de barragem)	Jan./2012	35

3.2.2. Amostragem das populações e coleta de material

Foram amostrados de 40 a 45 indivíduos em cada população de *H. stigonocarpa*, num total de 256 indivíduos, sendo 174 em plantios de recuperação e 82 em áreas nativas.

De acordo com LEBERG (2002), tamanhos amostrais grandes resultam em melhores estimativas da riqueza alélica, porém, a partir de certo ponto, o aumento no número de indivíduos amostrados não acarreta em aumento da variabilidade genética captada, ou seja, a relação entre o tamanho amostral e a riqueza alélica é assintótica. Segundo FREELAND (2005), o tamanho amostral ideal é de no mínimo de 30 a 40, porém isso depende da variabilidade do loco em análise. BERG & HAMRICK (1997) afirmam que tamanhos amostrais de 30 indivíduos por população podem ser considerados suficientes para a estimativa das frequências alélicas dentro das populações quando os marcadores utilizados apresentam locos com padrão de herança codominante, caso dos marcadores aqui utilizados.

A amostragem nas áreas nativas foi feita de maneira aleatória, com o maior espaçamento possível entre indivíduos, visto que, mesmo em população com distribuição espacial contínua, a reprodução cruzada pode ser restrita a pequenas distâncias devido ao baixo alcance da dispersão, diferenciando as populações (WRIGHT, 1943). Além disso, tal diferenciação genética pode também ser favorecida pelas próprias variações naturais do ambiente (MEFFE & CARROL, 1994). Nas áreas nativas, foram amostrados apenas indivíduos com DAP (diâmetro a altura do peito) superior à 10 cm, visando não misturar indivíduos da geração dos parentais (adultos) com aqueles da geração juvenil. Todos os indivíduos amostrados nas áreas nativas foram georreferenciados.

De cada indivíduo amostrado foi coletado material foliar e/ou de câmbio vascular. Partes vegetativas de plantas, como tecidos de câmbio vascular e tecidos foliares, possibilitam a análise dos genótipos atuais presentes na população, ao invés do potencial genético representado por sementes (BOTHMER & SEBERG, 1995).

Foram coletadas preferencialmente folhas jovens, sem danos mecânicos ou sinais de doença, as quais, em estado fresco, foram embaladas em jornal úmido para prevenir a perda de viabilidade e saco plástico devidamente identificado (Figura 3.3 A) visto que o material fresco é aquele que oferece melhores resultados na extração de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). O material de câmbio foi coletado apenas em casos de dificuldade de obtenção de folhas jovens ou de boa qualidade. As amostras do tecido do câmbio vascular foram obtidas com o auxílio de uma ferramenta de metal cilíndrica utilizada para retirada da casca e corte de discos do câmbio com 2,5 cm de diâmetro, os quais foram, então, colocados em microtubos de 2 ml contendo 1,5 ml de tampão de

transporte para manter a integridade do DNA, como feito por AZEVEDO (2007) (Figura 3.3 B e C).



Figura 3.2. Coleta de material. A. Material foliar embalado e identificado. B. Processo de retirada de material de câmbio vascular. C. Microtubo contendo tampão de transporte e material de câmbio coletado.

Durante a estadia em campo para coleta das amostras de folha e de câmbio foram armazenadas em geladeira para manutenção da viabilidade, visto que, de acordo com BOTHMER & SEBERG (1995), amostras frescas de tecido vegetal devem ser armazenadas em locais úmidos e frios. As amostras foram, então, encaminhadas para o Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGV - Cenargen), Brasília – DF, para a realização dos procedimentos laboratoriais. Neste laboratório, as amostras foliares foram armazenadas em câmara fria (temperatura de 3 a 5°C) e as amostras de câmbio em congelador (temperatura de -20°C) até a fase de extração de DNA.

3.2.3. Procedimentos laboratoriais

Extração e quantificação de DNA

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Cenargen. A extração de DNA das amostras foi realizada seguindo o protocolo descrito por DOYLE & DOYLE (1987), que utiliza CTAB (Brometo de cetil-trimetil amônio), porém, ao invés da maceração ser feita com nitrogênio líquido, foi realizada através do aparelho *Mini-Beadbeater-96 (Biospec)* (Figura 3.5 A). A quantificação do DNA foi feita através da

técnica de eletroforese e comparação com DNA padrão (λ DNA) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) (Figura 3.5 B). A partir da quantificação foi feita a diluição das amostras de DNA em água destilada para a concentração de 5 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), a qual foi checada pelo espectrofotômetro para quantificação de ácidos nucleicos e proteínas *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific).

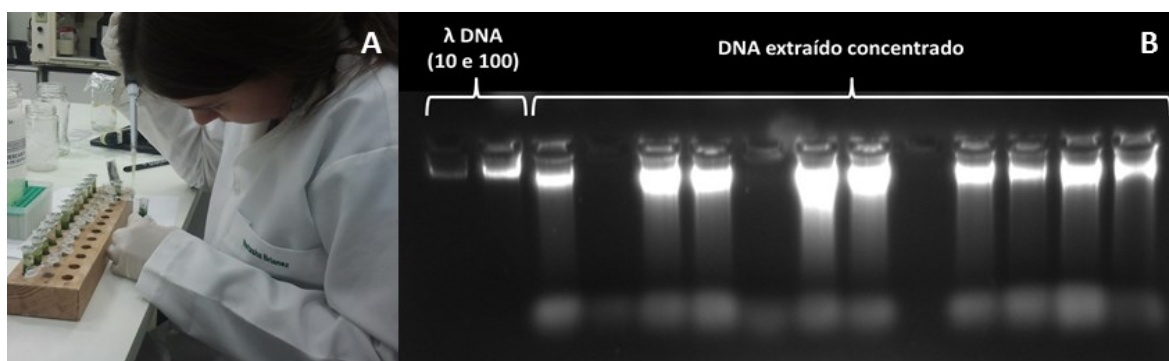


Figura 3.3. Extração e quantificação de DNA. A. Processo de extração de DNA B. Quantificação de DNA extraído em gel de agarose.

Amplificação e genotipagem de locos microssatélites

As regiões com microssatélites foram amplificadas através da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando *primers* desenvolvidos para *Hymenaea courbaril* e transferidos para *H. stigonocarpa* (CIAMPI et al., 2008) (Tabela 3.2). A reação de PCR foi composta pela seguinte combinação de reagentes: 4 μL de DNA a 5 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$; 0,2 μL de Taq DNA polimerase a 5U/ μL ; 1,3 μL de dNTP a 2,5 mM; 1,3 μL de BSA a 2,5 mg/mL; 0,36 μL de *primer* a 10 μM ; 1,3 μL de tampão para PCR a 10x (10 mM de Tris-HCl; pH 8,3; 50 mM de KCl) e 4,54 μL de água ultrapura. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*).

O programa utilizado para a reação de amplificação consistiu de: 95°C por cinco minutos; 30 ciclos compostos por 95°C por um minuto, temperatura de anelamento (Tabela 3.2) por um minuto e 72°C por um minuto; e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Para os *primers* Hc 17, Hc 33 e Hc 42 foi utilizado programa do tipo *touchdown* (KORBIE & MATTICK, 2008), constituído de: 95°C por cinco minutos; 12 ciclos compostos por 95°C por um minuto, temperatura de anelamento inicial e a partir do segundo ciclo diminuindo $\Delta^\circ\text{C}$ a cada ciclo (Tabela 3.2) por um minuto e 72°C por um minuto; 23 ciclos

compostos por 95°C por um minuto, temperatura de anelamento final (Tabela 3.2) por um minuto e 72°C por um minuto; e, por fim, uma extensão final de 72°C por 20 minutos.

Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio, utilizando, para isso, a técnica de eletroforese (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) (Figura 3.6 A). Para comparação dos tamanhos dos fragmentos amplificados foi utilizado o DNA *ladder* 1Kb da *Invitrogen*. A separação dos fragmentos microssatélites amplificados foi feita no analisador automático de fragmentos ABI 3730 com *primers* marcados com diferentes fluorocromos, em conjuntos *multiplex*, (GUICHOUX et al., 2011). Para tanto, foi utilizada a mistura de HiDi (18µl), marcador interno (ROX) (1 µl) e reação de PCR (1 µl), a qual foi desnaturada por 5 minutos a 95°C. A detecção dos picos de fluorescência e a genotipagem foram feitas com o *software GeneMapper* versão 4.1 (*Applied Biosystems*) (Figura 3.6 B). O arredondamento dos tamanhos alélicos foi realizado através do *software* AlleloBin (PRASANTH et al., 2006). A partir dos genótipos obtidos nesta fase foram estimados todos os parâmetros utilizados nas análises.

Tabela 3.2. *Primers* para *H. stigonocarpa*, temperaturas de anelamento utilizadas e amplitudes alélicas obtidas.

<i>Primer</i>	Sequência (F: <i>Foward</i> ; R: <i>Reverse</i>)	Temperatura de anelamento (°C)	Amplitude alélica (pb)
Hc 12	F: TGTTC CAATTTATGTC CATGGTT R: TGGATGGTTGTGAAGAAAAGG	60	141 – 197
Hc 14	F: CATTCTGCCATCGGTAGGTT R: TCACCCAAACAGGAGTGAA	58	110 – 150
Hc 17	F: TGATTTCAATCCCCCTTGC R: GGTCAAAGAAAATGCTGGCT	<i>Touchdown</i> (61-55°C; Δ: 0,5°C)	99 – 125
Hc 33	F: ACAAATCAACTTTCTTTGAAGC R: TTGACGCTTATTTGCACCA	<i>Touchdown</i> (61-55°C; Δ: 0,5°C)	122 – 136
Hc 34	F: CCAGCCCATGACGAAGT R: GGTGTCGTGTTGTGTATGGC	58	183 – 211
Hc 40	F: CCTCTCTCCCAAATTCACGA R: TGCAATAGAATTTCCGAGGC	60	158 – 194
Hc 42	F: TGGCTAAAAGTTGGGAGGGT R: TTCCCCCTTTTCATGTTGTC	<i>Touchdown</i> (62-56°C; Δ: 0,5°C)	117 – 157

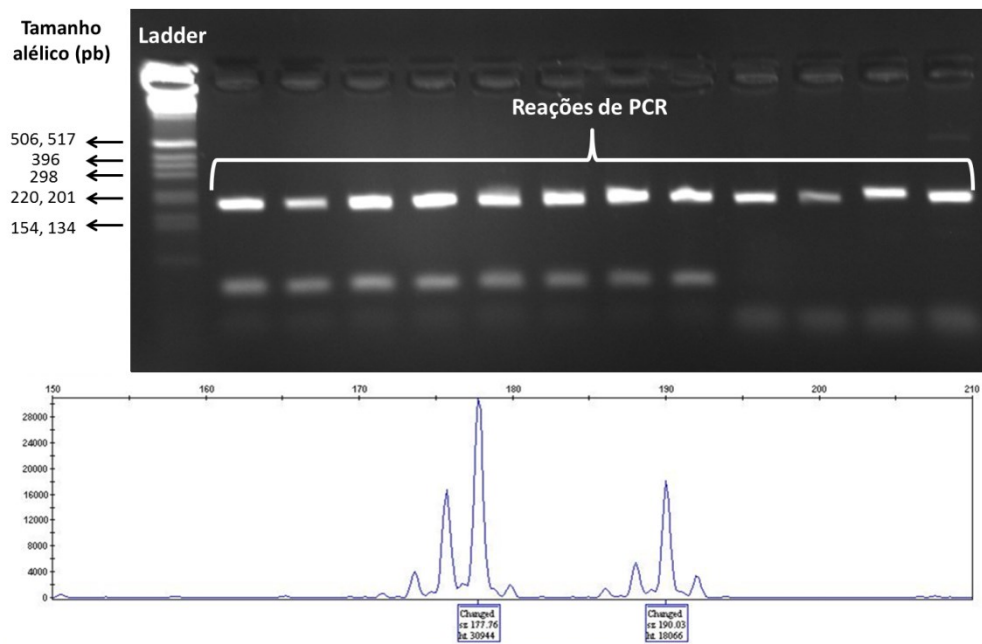


Figura 3.4. Amplificação e genotipagem de locos SSR. A. Verificação de ocorrência de amplificação de locos microssatélites em gel de agarose. B. Genotipagem de indivíduo heterozigoto para o loco sob análise através do *software GeneMapper*.

3.2.4. Análise de dados

Caracterização da variabilidade genética intra e interpopulacional

Para caracterização da variabilidade genética intrapopulacional foram estimados os seguintes parâmetros: frequências alélicas, número de alelos por loco (A), número de alelos privados (A_p), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), heterozigosidade máxima ($H_{máx}$), coeficiente de endogamia da população (f) (WEIR, 1996). As frequências alélicas e o número de alelos por loco (A) foram calculados diretamente dos genótipos obtidos dos indivíduos. Foram considerados alelos raros aqueles com frequência relativa inferior a 5%, visto que KIMURA (1983) define alelos raros como aqueles com frequência inferior a um valor pequeno e pré-definido e que o valor de 5% é frequentemente utilizado (SEBBEN et al., 2000; KAGEYAMA et al., 2003).

As estimativas da heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e coeficiente de endogamia da população (f) foram calculadas de acordo com WEIR (1996), utilizando para isto o *software* GDA (*Genetic Data Analysis*) (LEWIS & ZAYKIN, 2001), o qual também foi utilizado para a obtenção

do número de alelos privados (A_p). A consistência das estimativas do coeficiente de endogamia (f) foi avaliada através do método de *bootstrap*, utilizando para isto 10.000 reamostragens e intervalo de confiança a 95% (WEIR, 1996), os quais foram obtidos através do *software* GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001).

A heterozigosidade máxima ($H_{máx}$) foi estimada através da seguinte equação: $H_{máx} = \frac{A-1}{A}$, em que A = número de alelos por loco, como realizado por AZEVEDO, (2007) e RAPOSO et al. (2007). A dimensão da diversidade genética foi analisada através da relação entre os valores de H_e e $H_{máx}$, e a dimensão dos valores de heterozigosidade observada foi analisada pela relação entre os valores de H_o e H_e .

Para caracterização da variabilidade genética interpopulacional foi estimada a divergência genética (θ_p) entre pares de populações e para o conjunto de populações de cada espécie, de acordo com WEIR (1996), utilizando para isto o *software* GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001). A consistência das estimativas deste parâmetro foi avaliada através do método de *bootstrap*, utilizando 10.000 reamostragens e intervalo de confiança a 95% (WEIR, 1996), os quais foram obtidos através do *software* GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001). Os parâmetros f e θ_p são equivalentes aos parâmetros FIS e FST, respectivamente, das estatísticas F de Wright (MORAES et al., 1999).

Aderência das frequências genóticas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e dos locos ao equilíbrio de ligação

Foram estimadas probabilidades (P-valores) de aderência das frequências genóticas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco estudado através do teste exato de Fisher (WEIR, 1996). A constatação estatística da aderência da população a este equilíbrio não significa esta seja muito grande, panmítica, ausente de mutação, migração e seleção, mas sim que suas frequências genóticas aderem ao esperado para este equilíbrio, o que pode ocorrer devido ao anulamento de forças evolutivas (WHITE et al., 2007). Os P-valores foram estimados pelo *software* GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001), com base em 10.000 reamostragens *bootstrap* (WEIR, 1996) e nível de significância a 5% de probabilidade.

Foram estimadas probabilidades (P-valores) de aderência dos locos estudados ao equilíbrio de ligação através do teste exato de Fisher (WEIR, 1996). Equilíbrio de ligação

refere-se à inexistência de associações entre locos, as quais podem ocorrer devido à ligações genéticas e podem causar viés nas análises estatísticas (WEIR, 1996). As probabilidades foram estimadas pelo *software* GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001), utilizando para isto 10.000 reamostragens *bootstrap* (WEIR, 1996) e nível de significância a 5% de probabilidade.

Detecção de alelos nulos

Foram feitos testes para detecção da presença de alelos nulos nas populações e nos locos em análise. A verificação da presença de alelos nulos e de sua interferência nas frequências alélicas foi realizada através do *software* *Micro-Checker* (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Este *software* utiliza simulações de Monte Carlo (*bootstrap*) e se baseia na teoria de equilíbrio de Hardy-Weinberg para detectar diferenças entre frequências observadas e esperadas de homozigotos e estimar a frequência de quaisquer alelos nulos (VAN OOSTERHOUT et al., 2004; VAN OOSTERHOUT et al., 2003). Para tanto, foi utilizado intervalo de confiança de 95% e 1.000 simulações de Monte Carlo. Foi utilizada a equação 1 de BROOKFIELD (1996) para estimar a frequência de alelos nulos, a qual se baseia no déficit de heterozigotos e é considerada mais adequada para situações em que existem amostras com falhas e se desconhece o motivo, podendo ser devido a alelos nulos, falhas na PCR ou problemas de degradação do DNA (VAN OOSTERHOUT et al., 2004; VAN OOSTERHOUT et al., 2003).

Tamanhos efetivos e tamanhos mínimos viáveis das populações

Foram estimados os tamanhos efetivos populacionais (N_e) de todas as populações, por meio da equação: $N_e = \frac{n}{(1+f)}$, em que n = tamanho amostral da população e f = coeficiente de endogamia, de acordo com VENCOVSKY & CROSSA (2003). A população mínima viável (PMV) para conservação genética *in situ* foi calculada através da equação: $PMV = \frac{N_e(ref) \times n}{N_e}$, em que $N_e(ref)$ = tamanho efetivo populacional de referência, n = tamanho amostral e N_e = tamanho efetivo populacional, conforme feito por SILVA & PINTO (2009).

Diferentes tamanhos efetivos populacionais de referência foram propostos para conservação em curto ou longo prazo por diferentes autores. FRANKLIN & FRANKHAM (1998) propõem tamanhos efetivos de referência entre 500 e 1.000 para manter o potencial

evolutivo de populações ameaçadas em longo prazo, enquanto que FRANKEL & SOULÉ (1981) sugerem que tamanho efetivo de 50 seja suficiente para reduzir os efeitos de endogamia em curto prazo. Mais especificamente para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução, SEBBENN (2003) propõe tamanho efetivo de 500. Assim, foram utilizados tamanhos efetivos de referência iguais a 500 e a 50, como propostos por estes autores, para conservação em longo e em curto prazo, respectivamente. Foi verificada ainda a representatividade genética das amostras das populações estudadas através da relação entre N_e e n , conforme feito por RAPOSO et al. (2007).

Distribuição espacial dos genótipos das populações nativas

A distribuição espacial dos genótipos nas populações nativas foi analisada através de estimativas do coeficientes de coancestria (θ_{xy}), baseado em LOISELLE et al. (1995), entre pares de plantas dentro de classes de distância definidas para os locos em conjunto. Coancestria refere-se à probabilidade de que dois alelos homólogos identificados aleatoriamente em dois indivíduos sejam idênticos por descendência (LYNCH & WALSH, 1998). Para tanto, foram calculados valores de θ_{xy} para a média de pares de indivíduos dentro de cada uma das oito classes de distância determinadas. O tamanho destas classes de distância foi definido em função do número igual de pares de indivíduos comparados dentro de cada classe, o que gera classes de distância de tamanhos diferentes, porém resulta em maior precisão nas comparações das estimativas de coeficientes de coancestria entre diferentes classes, visto que estes são estimados a partir do mesmo número de pares de indivíduos, possuindo, assim, a mesma precisão (GUIDUGLI, 2011). Os coeficientes de coancestria para cada classe de distância foram obtidos através do *software* SPAGeDI (*Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity*) versão 1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002-2009).

O erro padrão da média das estimativas foi obtido por reamostragem *jackknife* entre locos e, a partir deste, foram construídos intervalos de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente de coancestria médio estimado para cada classe de distância, conforme HARDY & VEKEMANS (2002-2009). Para testar se existe estruturação genética espacial, foi calculado o intervalo de confiança a 95% de probabilidade para cada valor observado em cada classe de distância, utilizando para isto 1.000 permutações de Monte Carlo para os indivíduos entre diferentes classes de distância (HARDY & VEKEMANS, 2002-2009). Os valores de erro padrão e intervalos de confiança para teste de ausência de estruturação

genética foram obtidos através do *software* SPAGeDI versão 1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002-2009).

Fluxo gênico entre populações nativas

O fluxo gênico entre as populações em áreas nativas foi estimado através da metodologia indireta proposta por WRIGHT (1951), com base no número de migrantes por geração (Nm), de acordo com a equação $Nm = \frac{(\frac{1}{\theta p}) - 1}{4}$, sendo θp a divergência genética entre populações, equivalente ao parâmetro F_{ST} das estatísticas F . Métodos indiretos como este estimam níveis de fluxo gênico que ocorreram no passado (SLATKIN, 1987) e medem apenas a dispersão que resultou em transmissão efetiva de genes (BROQUET & PETIT, 2009). O uso de Nm assume o modelo de ilhas, o qual pressupõe que as populações apresentam tamanhos efetivos iguais e que o fluxo gênico ocorre em proporções iguais entre estas (FUTUYMA, 1995). Apesar disso, essa metodologia apresenta robustez analítica em muitos casos (BROQUET & PETIT, 2009).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Variabilidade genética

O tamanho amostral nas populações de *H. stigonocarpa* variou de 32,86 (N1) a 39,14 (P2) (Tabela 3.3). Neste caso, todos os tamanhos amostrais foram maiores do que 30, tamanho considerado suficiente para a estimativa de frequências alélicas dentro das populações quando os marcadores são codominantes (BERG & HAMRICK, 1997), caso dos marcadores SSR. Os locos Hc 33 e Hc 42 apresentaram os menores tamanhos amostrais (194 e 191, respectivamente), enquanto que o loco Hc 14 apresentou o maior tamanho amostral, de 241, em comparação ao tamanho amostral total, de 256 indivíduos (Tabela 3.4).

As populações P1, P2, P5, P6, N1 e N2 apresentaram, respectivamente, 8,86; 7; 8; 7,86; 5,43 e 6,29 alelos em média por loco (Tabela 3.3). Apesar do número de alelos poder ser afetado por diferenças no tamanho amostral (KALINOWSKI, 2004), as diferenças relativamente pequenas nos tamanhos amostrais entre as populações estudadas permitem fazer comparações entre estas. Dessa maneira, ambas as populações em áreas nativas apresentaram número de alelos médio por loco inferior aos valores encontrados nas

populações em plantios de recuperação de áreas degradadas. As populações P1, P2, P5, P6, N1 e N2 apresentaram, respectivamente, 12, 7, 8, 3, 1 e 1 alelos privados (Tabela 3.3). Com relação ao total de alelos por população, foram observados 37% de alelos raros na população P1 (Figura 3.7); 45% em P2 (Figura 3.8), 46% em P5 (Figura 3.9), 45% em P6 (Figura 3.10), 47% em N1 (Figura 3.11) e 43% de alelos raros em N2 (Figura 3.12).

Tabela 3.3. Tamanho amostral (n), número de alelos (A), alelos privados (Ap), heterozigosidade máxima ($Hmáx$), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), relação entre heterozigosidades esperada e máxima ($He/Hmáx$), relação entre heterozigosidades observada e esperada (Ho/He) e coeficiente de endogamia (f) das populações de *H. stigonocarpa* nas áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e nas áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, MG, para os sete locos avaliados.

Área	Loco	n	A	Ap	Hmáx	He	Ho	He/Hmáx	Ho/He	f	
P1	Hc 12	42	8	2	0,875	0,795	0,595	0,909	0,749	0,254	
	Hc 14	41	12	4	0,917	0,862	0,781	0,940	0,906	0,095	
	Hc 17	29	6	0	0,833	0,766	0,828	0,919	1,081	-0,082	
	Hc 33	34	6	1	0,833	0,753	0,177	0,903	0,234	0,768	
	Hc 34	34	10	1	0,900	0,776	0,559	0,862	0,720	0,283	
	Hc 40	37	9	2	0,889	0,729	0,595	0,821	0,815	0,187	
	Hc 42	36	11	2	0,909	0,885	0,833	0,974	0,941	0,060	
	Total			62	12						
	Média	36,14	8,86			0,887	0,795	0,624	0,896	0,785	0,218
IC										0,067 a 0,422	
P2	Hc 12	38	6	1	0,833	0,733	0,553	0,879	0,754	0,248	
	Hc 14	43	2	0	0,500	0,208	0,233	0,416	1,118	-0,120	
	Hc 17	42	6	2	0,833	0,717	0,762	0,861	1,062	-0,063	
	Hc 33	41	4	0	0,750	0,627	0,415	0,836	0,661	0,342	
	Hc 34	39	11	1	0,909	0,839	0,744	0,922	0,887	0,115	
	Hc 40	35	9	1	0,889	0,741	0,686	0,833	0,926	0,075	
	Hc 42	36	11	2	0,909	0,777	0,333	0,855	0,429	0,575	
	Total			49	7						
	Média	39,14	7,00			0,857	0,663	0,532	0,774	0,802	0,200
IC										0,043 a 0,368	

Tabela 3.3. (continuação).

Área	Loco	n	A	Ap	Hmáx	He	Ho	He/Hmáx	Ho/He	f	
P5	Hc 12	32	7	2	0,857	0,517	0,250	0,603	0,484	0,520	
	Hc 14	40	7	1	0,857	0,715	0,425	0,834	0,594	0,409	
	Hc 17	31	9	1	0,889	0,791	0,677	0,889	0,857	0,145	
	Hc 33	32	5	1	0,800	0,542	0,344	0,678	0,634	0,370	
	Hc 34	39	8	0	0,875	0,739	0,692	0,845	0,937	0,064	
	Hc 40	38	12	1	0,917	0,573	0,553	0,625	0,965	0,036	
	Hc 42	29	11	2	0,909	0,773	0,207	0,851	0,268	0,736	
	Total			59	8						
	Média	34,43	8,00			0,881	0,664	0,450	0,754	0,677	0,326
IC										0,146 a 0,522	
P6	Hc 12	41	7	1	0,857	0,447	0,366	0,521	0,819	0,183	
	Hc 14	41	4	0	0,750	0,339	0,146	0,452	0,432	0,571	
	Hc 17	36	10	2	0,900	0,775	0,583	0,861	0,753	0,250	
	Hc 33	30	3	0	0,667	0,520	0,567	0,781	1,089	-0,091	
	Hc 34	41	8	0	0,875	0,811	0,756	0,927	0,932	0,069	
	Hc 40	37	12	0	0,917	0,883	0,757	0,964	0,857	0,145	
	Hc 42	30	11	0	0,909	0,848	0,267	0,932	0,315	0,689	
	Total			55	3						
	Média	36,57	7,86			0,873	0,660	0,492	0,757	0,745	0,258
IC										0,087 a 0,464	
N1	Hc 12	34	5	1	0,800	0,328	0,353	0,410	1,075	-0,076	
	Hc 14	37	4	0	0,750	0,530	0,946	0,707	1,784	-0,804	
	Hc 17	34	5	0	0,800	0,363	0,324	0,454	0,891	0,110	
	Hc 33	27	4	0	0,750	0,704	0,630	0,938	0,895	0,107	
	Hc 34	32	7	0	0,857	0,679	1,000	0,792	1,474	-0,485	
	Hc 40	36	4	0	0,750	0,207	0,222	0,276	1,074	-0,075	
	Hc 42	30	9	0	0,889	0,657	0,567	0,739	0,862	0,140	
	Total			38	1						
	Média	32,86	5,43			0,816	0,495	0,577	0,607	1,165	-0,169
IC										-0,458 a 0,092	
N2	Hc 12	40	2	0	0,500	0,162	0,175	0,323	1,082	-0,083	
	Hc 14	39	5	0	0,800	0,647	0,487	0,808	0,753	0,249	
	Hc 17	34	7	0	0,857	0,410	0,382	0,478	0,934	0,067	
	Hc 33	30	4	0	0,750	0,714	0,600	0,951	0,841	0,161	
	Hc 34	36	4	0	0,750	0,544	0,639	0,725	1,175	-0,178	
	Hc 40	36	11	0	0,909	0,695	0,722	0,765	1,039	-0,039	
	Hc 42	30	11	1	0,909	0,836	0,500	0,920	0,598	0,406	
	Total			44	1						
	Média	35,00	6,29			0,841	0,572	0,501	0,681	0,875	0,127
IC										-0,042 a 0,268	

Intervalo de Confiança (IC) = 95%, com base em 10.000 reamostragens *bootstrap*.

Tabela 3.4. Tamanho amostral (n), número de alelos (A), número de alelos privados (Ap) encontrados nas populações, heterozigidade máxima ($Hmáx$), heterozigidade esperada (He), heterozigidade observada (Ho), relação entre heterozigidades esperada e máxima ($He/máx$) e coeficiente de endogamia (f) para os sete locos analisados em seis populações de *H. stigonocarpa* localizadas em Paracatu, MG.

Loco	n	A	Ap	Hmáx	He	Ho	He/Hmáx	Ho/He	f
Hc 12	227	15	7	0,933	0,579	0,388	0,620	0,670	0,331
Hc 14	241	13	5	0,923	0,633	0,494	0,685	0,781	0,220
Hc 17	206	13	5	0,923	0,681	0,592	0,737	0,870	0,130
Hc 33	194	7	2	0,857	0,781	0,443	0,911	0,568	0,433
Hc 34	221	15	2	0,933	0,825	0,729	0,884	0,883	0,118
Hc 40	219	19	4	0,947	0,712	0,589	0,751	0,828	0,172
Hc 42	191	21	7	0,952	0,905	0,461	0,951	0,509	0,492
Total		103	32						
Média	214,14	14,71	4,57	0,932	0,731	0,528	0,784	0,723	0,278

Analisando as distribuições de frequências alélicas das populações de *H. stigonocarpa* (Figuras 3.7 a 3.12), é possível observar que a maioria delas foi do tipo modal ou bimodal, com frequências alélicas relativamente bem distribuídas. Apesar da distribuição de frequências alélicas esperada pelo Modelo de Passos de Mutação ser unimodal, distribuições bimodais e até mesmo plurimodais são muitas vezes observadas (NEBEL et al., 2001). Algumas distribuições foram menos uniformes, com frequência de apenas um alelo superior a 0,5 e muito mais alta do que as frequências dos demais, como aquele do loco Hc 14 para a população P2; Hc 12, Hc 33 e Hc 40 para P5; Hc 12 e Hc 14 para P6; Hc 12, Hc 17 e Hc 40 para N1; e locos Hc 12 e Hc 17 para a população N2. Tais alelos com frequências muito altas podem futuramente ser fixados, principalmente na ausência de fluxo gênico de outras populações (SLATKIN, 1987). Estes locos nestas populações foram justamente os que apresentaram os menores valores de heterozigidade esperada, visto que este parâmetro é calculado com base nas frequências alélicas (ALLENDORF & LUIKART, 2007).

As populações em plantios de recuperação apresentaram as maiores heterozigidades médias esperadas, as quais foram 0,795 para P1; 0,663 para P2; 0,664 para P5 e 0,660 para P6, enquanto que as populações nativas estudadas, por sua vez, apresentaram os menores valores, de 0,495 para N1 e 0,572 para N2 (Tabela 3.3). A heterozigidade máxima é o parâmetro que mostra qual a máxima heterozigidade possível com relação ao número de alelos existentes na população, sendo bom critério para análise da representatividade da heterozigidade esperada encontrada (RIBAS &

KAGEYAMA, 2004). Assim, as populações nativas, as quais apresentaram menor número de alelos, apresentaram menores valores de heterozigosidade máxima (Tabela 3.3). Contudo, a proporção entre a heterozigosidade esperada e a máxima para estas populações também foi consideravelmente menor.

A heterozigosidade média observada foi maior nas populações P1, N1 e P2, (0,624, 0,577 e 0,532, respectivamente), e menor nas populações P5, P6 e N2 (0,450, 0,492 e 0,501, respectivamente) (Tabela 3.3). Dessa maneira, o padrão de menor variabilidade genética para as populações nativas observado em parâmetros como número de alelos e heterozigosidade esperada não ocorreu com relação à heterozigosidade observada, tendo as populações nativas apresentado valores intermediários deste.

Todas as populações em plantios de recuperação apresentaram coeficientes de endogamia positivos, com maior valor para a população P5 (0,326), seguida por P6 (0,258), P1 (0,218) e P2 (0,200) (Tabela 3.3). Os intervalos de confiança do coeficiente de endogamia para estas populações foram inteiramente positivos, o que indica existir consistência nas estimativas. As populações em áreas nativas N1 e N2, por sua vez, apresentaram coeficientes de endogamia iguais a -0,169 e 0,127, respectivamente, porém os intervalos de confiança indicam que estes valores não foram consistentes (Tabela 3.3).

As estimativas de frequências de alelos nulos obtidas foram significativas ($>0,20$) para o loco Hc 33 para a população P1, Hc 42 para as populações P2, P5 e P6 e em nenhum loco para as populações nativas, N1 e N2. Contudo, as frequências de alelos nulos das populações em plantios de recuperação não podem ser devidamente estimadas e interpretadas visto que estas são formadas por indivíduos provenientes de diferentes populações, não possuindo origem na reprodução de uma geração comum anterior. Como a estimativa de frequências de alelos nulos se baseia no déficit de heterozigotos com relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (VAN OOSTERHOUT et al., 2004), as estimativas significativas encontradas nas populações em plantios provavelmente se devem simplesmente à ocorrência de muitos genótipos homozigotos no conjunto dos indivíduos com diferentes procedências reunidos nestes plantios, e não à ocorrência de alelos nulos.

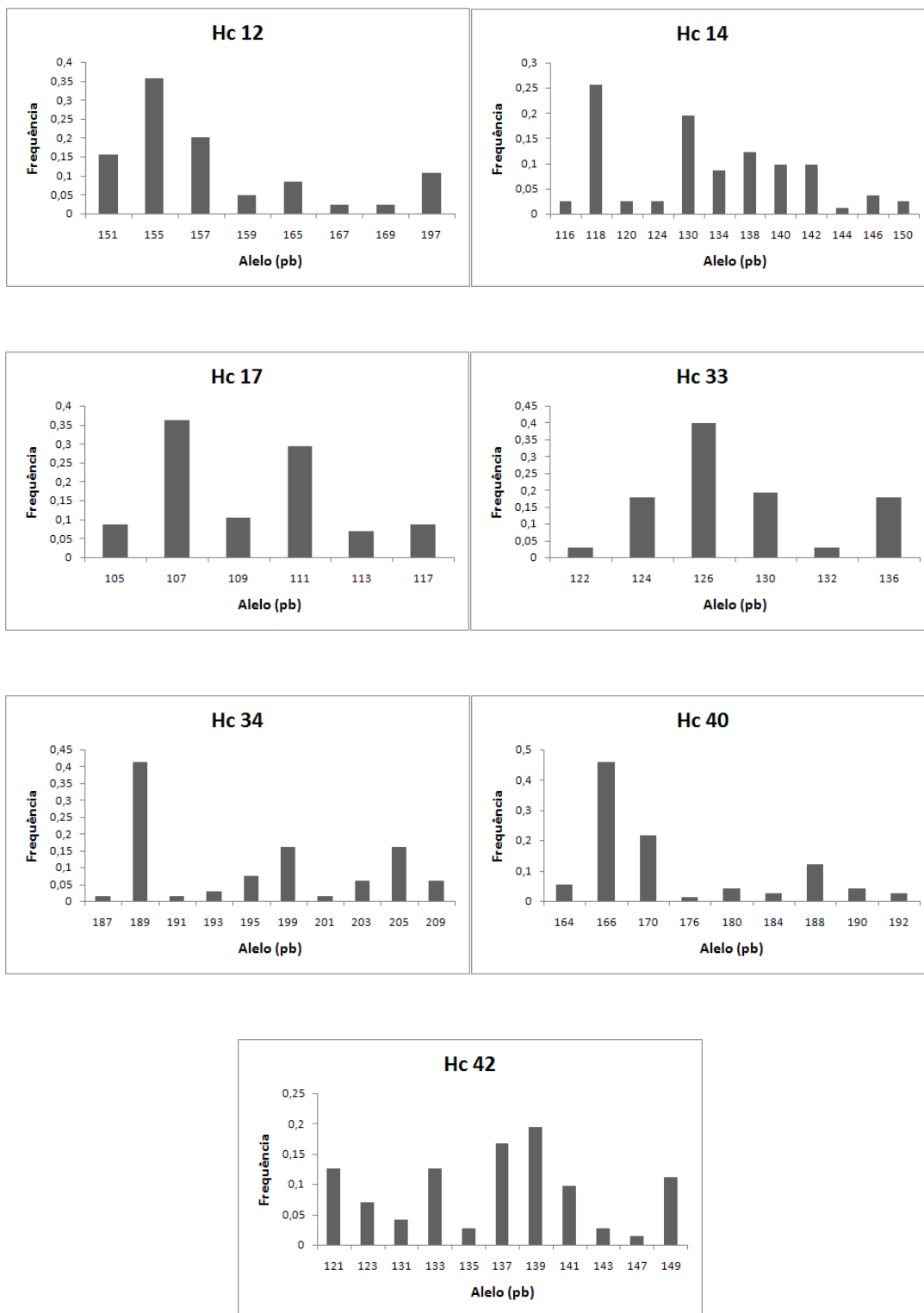


Figura 3.5. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de *H. stigonocarpa* em área de plantio de recuperação – P1, amostrada em Paracatu, MG.

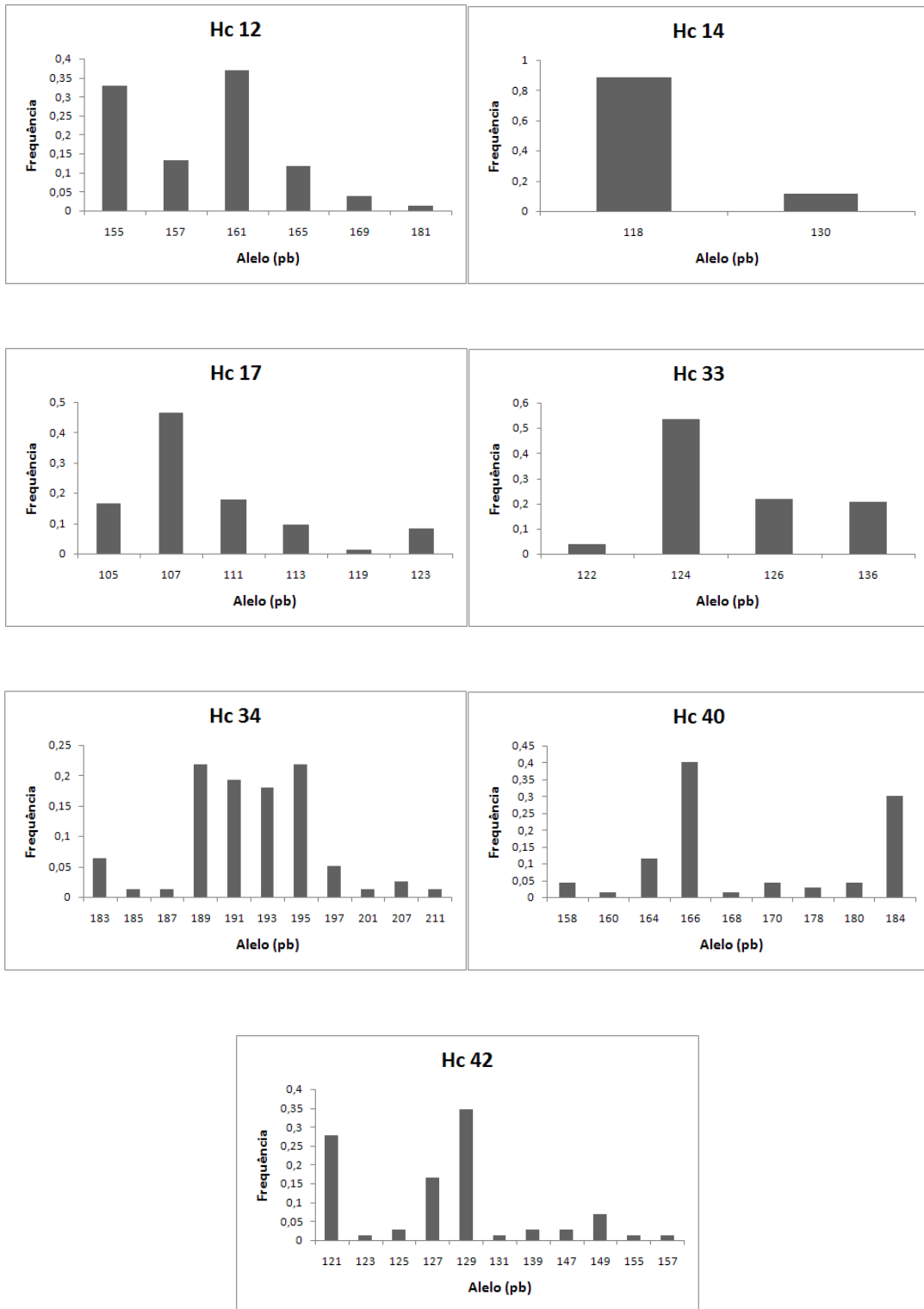


Figura 3.6. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de *H. stigonocarpa* em área de plantio de recuperação – P2, amostrada em Paracatu, MG.

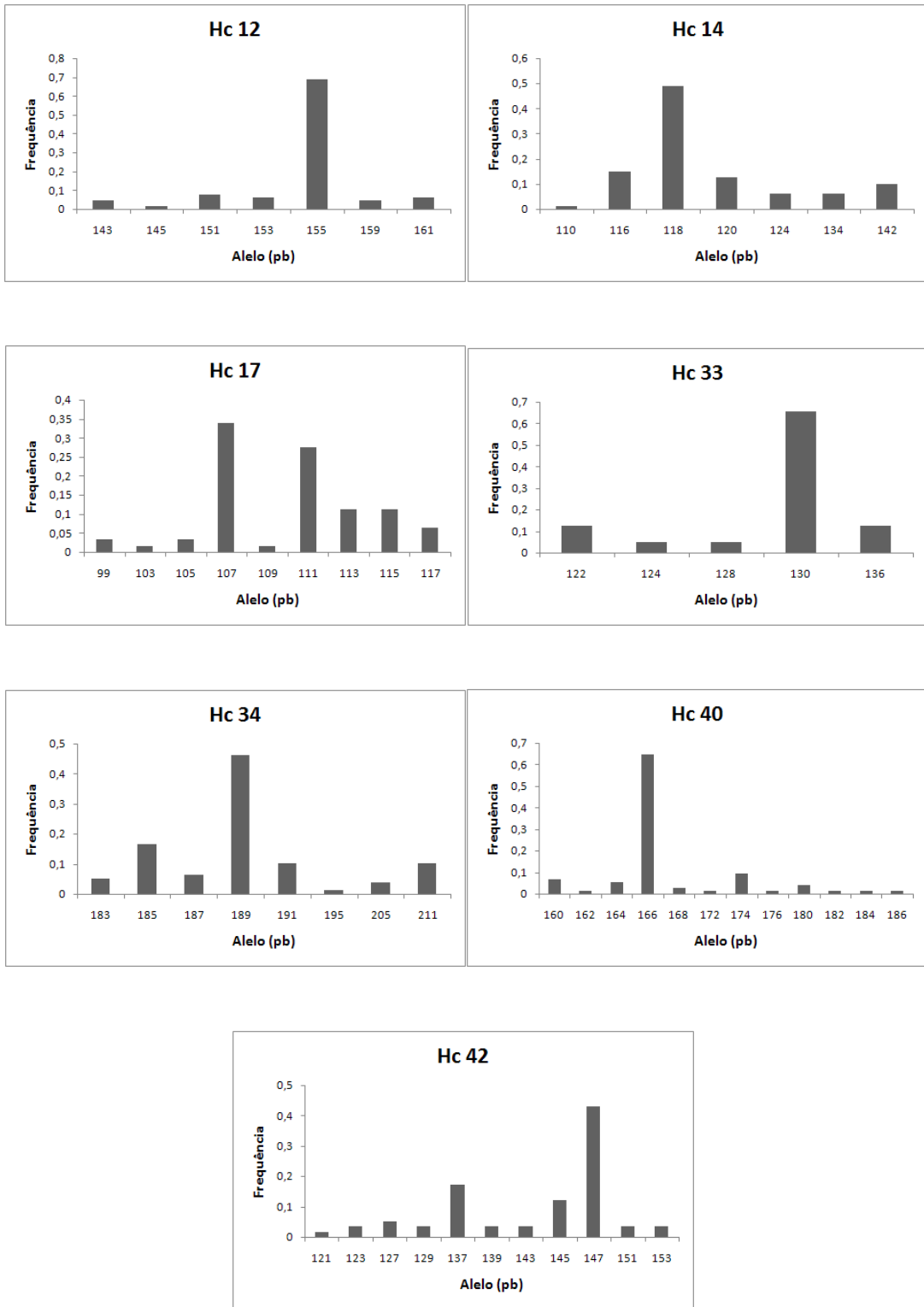


Figura 3.7. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de *H. stigonocarpa* em área de plantio de recuperação – P5, amostrada em Paracatu, MG.

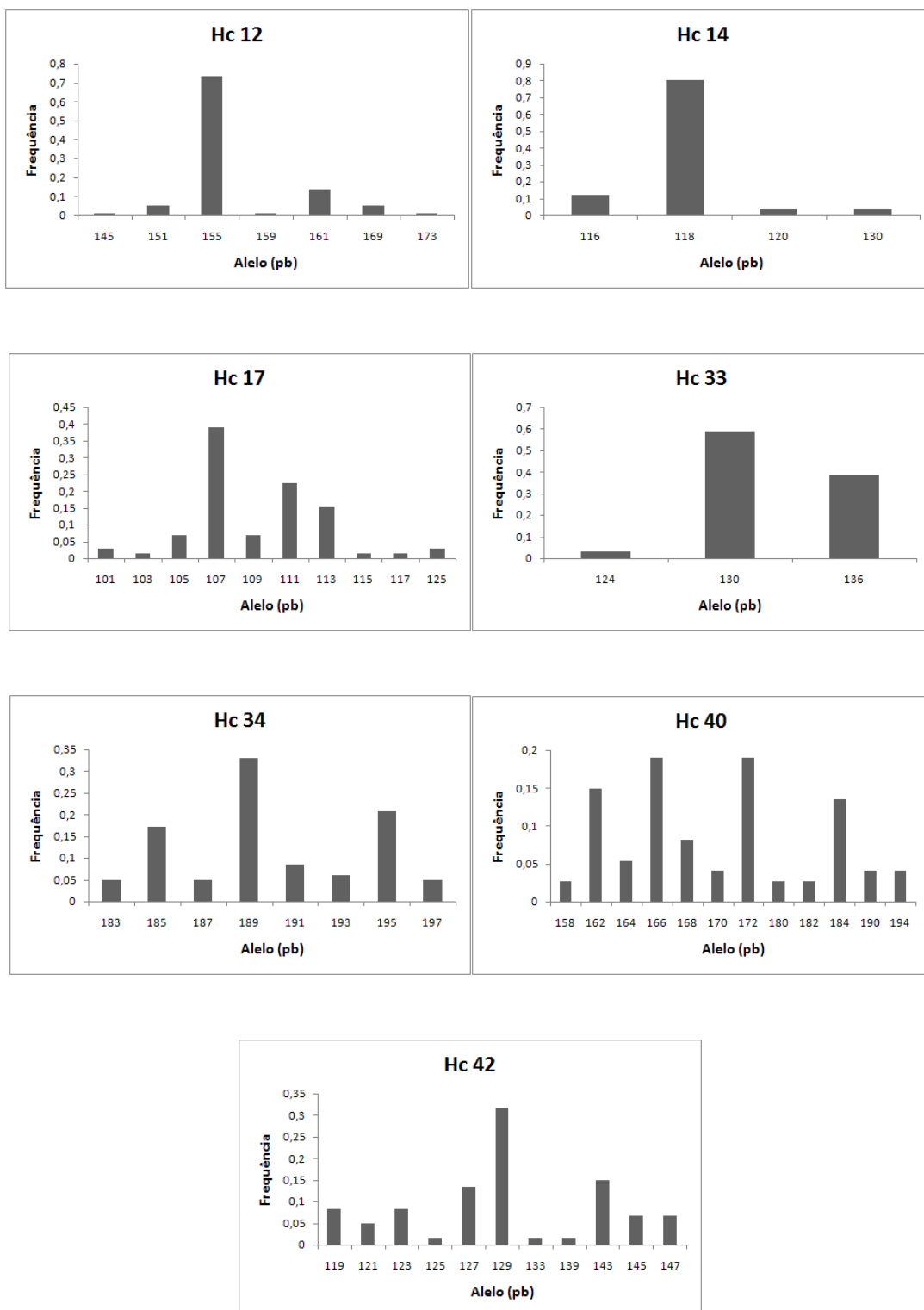


Figura 3.8. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de *H. stigonocarpa* em área de plantio de recuperação – P6, amostrada em Paracatu, MG.

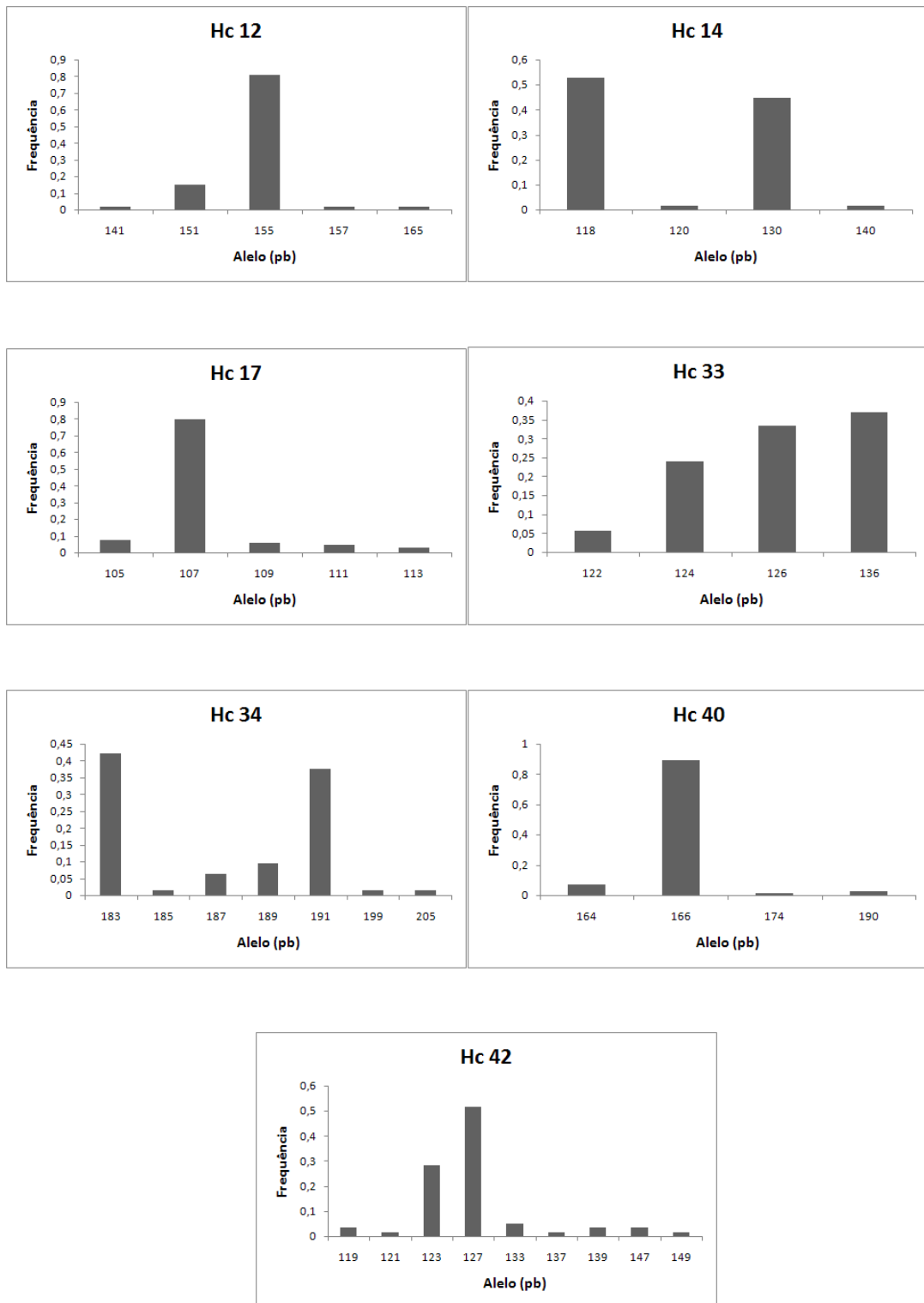


Figura 3.9. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de *H. stigonocarpa* em área nativa de Cerrado sentido restrito – N1, amostrada em Paracatu, MG.

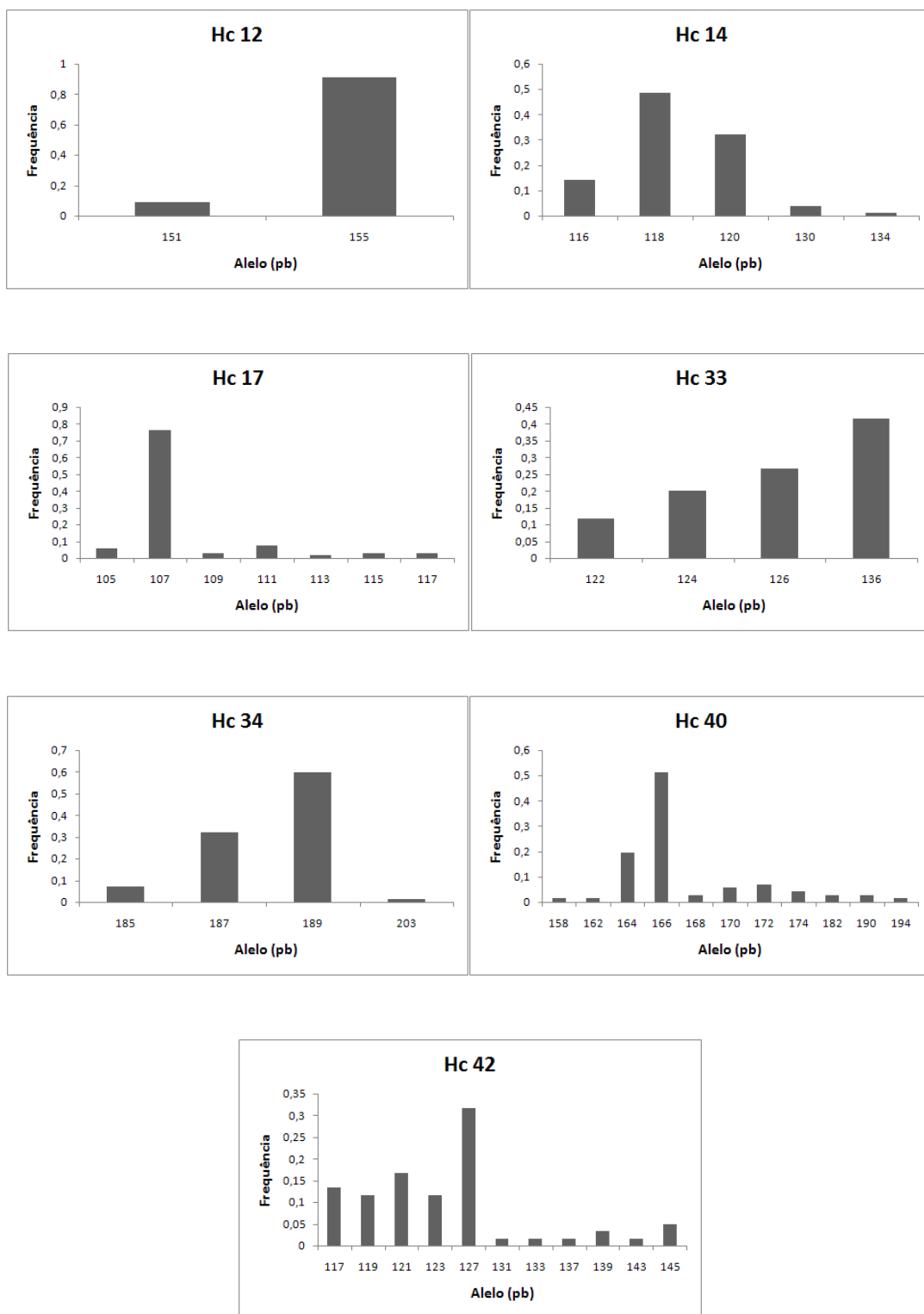


Figura 3.10. Distribuição das frequências alélicas dos sete locos analisados na população de *H. stigonocarpa* em área nativa de Cerrado sentido restrito – N2, amostrada em Paracatu, MG.

Os tamanhos efetivos das populações P1, P2, P5, P6, N1 e N2 foram, respectivamente 29,67, 32,63, 25,96, 29,07 39,52, e 31,07 (Tabela 3.5). A avaliação das populações quanto a este parâmetro pode ser melhor visualizada através da relação entre o

tamanho efetivo e o amostral de cada população. Estas relações foram superiores para N1 e N2, (1,20 e 0,89, respectivamente) e inferiores para P1, P2, P5, P6 (0,82, 0,83, 0,75 e 0,79, respectivamente) (Tabela 3.5). Assim, as populações nativas apresentaram indivíduos com maior representatividade genética do que aqueles nas populações em plantios.

Tabela 3.5. Tamanho amostral (n), tamanho efetivo populacional (N_e), relação entre tamanho amostral e tamanho efetivo populacional (N_e/n), população mínima viável com tamanho efetivo de referência de 50 ($PMV_{(N_{eref}=50)}$) e de 500 ($PMV_{(N_{eref}=500)}$) das populações de *H. stigonocarpa* nas áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e nas áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, para os sete locos avaliados.

Área	Loco	n	N_e	N_e/n	PMV (Neref = 50)	PMV (Neref = 500)
P1	Hc 12	42	33,50	0,80	62,69	626,87
	Hc 14	41	37,43	0,91	54,77	547,70
	Hc 17	29	31,59	1,09	45,89	458,94
	Hc 33	34	19,23	0,57	88,41	884,14
	Hc 34	34	26,51	0,78	64,13	641,30
	Hc 40	37	31,17	0,84	59,34	593,43
	Hc 42	36	33,98	0,94	52,98	529,78
	Média	36,14	29,67	0,82	60,90	609,00
P2	Hc 12	38	30,44	0,80	62,41	624,09
	Hc 14	43	48,86	1,14	44,00	440,00
	Hc 17	42	44,83	1,07	46,84	468,40
	Hc 33	41	30,56	0,75	67,09	670,86
	Hc 34	39	34,99	0,90	55,73	557,25
	Hc 40	35	32,55	0,93	53,77	537,68
	Hc 42	36	22,86	0,64	78,73	787,34
	Média	39,14	32,63	0,83	59,98	599,80
P5	Hc 12	32	21,05	0,66	76,02	760,15
	Hc 14	40	28,39	0,71	70,44	704,41
	Hc 17	31	27,07	0,87	57,26	572,59
	Hc 33	32	23,36	0,73	68,48	684,84
	Hc 34	39	36,64	0,94	53,21	532,15
	Hc 40	38	36,68	0,97	51,80	517,99
	Hc 42	29	16,71	0,58	86,79	867,92
	Média	34,43	25,96	0,75	66,30	663,00
P6	Hc 12	41	34,65	0,85	59,16	591,56
	Hc 14	41	26,10	0,64	78,55	785,52
	Hc 17	36	28,80	0,80	62,50	625,00
	Hc 33	30	32,99	1,10	45,46	454,65
	Hc 34	41	38,36	0,94	53,44	534,36
	Hc 40	37	32,31	0,87	57,25	572,52
	Hc 42	30	17,76	0,59	84,45	844,50
	Média	36,57	29,07	0,79	62,91	629,05

Tabela 3.5. (continuação).

Área	Loco	n	Ne	Ne/n	PMV (Neref = 50)	PMV (Neref = 500)
N1	Hc 12	34	36,80	1,08	46,20	461,96
	Hc 14	37	188,65	5,10	9,81	98,07
	Hc 17	34	30,62	0,90	55,51	555,15
	Hc 33	27	24,39	0,90	55,35	553,54
	Hc 34	32	62,14	1,94	25,75	257,49
	Hc 40	36	38,91	1,08	46,26	462,57
	Hc 42	30	26,32	0,88	56,98	569,81
	Média	32,86	39,53	1,20	41,57	415,65
N2	Hc 12	40	43,64	1,09	45,83	458,33
	Hc 14	39	31,22	0,80	62,45	624,55
	Hc 17	34	31,85	0,94	53,37	533,70
	Hc 33	30	25,83	0,86	58,07	580,72
	Hc 34	36	43,78	1,22	41,11	411,12
	Hc 40	36	37,48	1,04	48,03	480,30
	Hc 42	30	21,34	0,71	70,31	703,07
	Média	35	31,07	0,89	56,33	563,25

A população mínima viável para conservação *in situ* em curto prazo, baseada num tamanho efetivo de referência de 50 (FRANKEL & SOULÉ, 1981), foi de 60,90; 59,98; 66,30; 62,91; 41,57 e 56,33 para as populações P1, P2, P5, P6, N1 e N2, respectivamente (Tabela 3.5). Considerando que os tamanhos demográficos das populações P1, P2 e P5 são, respectivamente, 59, 95 e 109, estas apresentam tamanhos muito próximos (P1) e maiores (P2 e P5) do que o mínimo viável para conservação *in situ* em curto prazo. Os dados quanto aos indivíduos sobreviventes na área P6 não foram coletados devido a este plantio ser recente.

3.3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação

Foram observado poucos locos com aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações em plantios de recuperação. Foram observados dois locos com probabilidades significativas para o teste exato de Fisher baseados em 10.000 reamostragens pelo método de *bootstrap*, a 5% de probabilidade, para P1 e P2, um loco em P6 e nenhum loco em P5. Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg evidenciados em vários locos nas populações em plantios de recuperação são corroborados pelos coeficientes de endogamia positivos e consistentes destas. Entretanto, estas populações são constituídas por indivíduos oriundos

de diferentes populações. Segundo HARTL & CLARK (1997), misturas de indivíduos que diferem quanto às frequências alélicas são difíceis de serem analisadas quanto a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em testes como o de Fisher. A análise da aderência das populações em plantios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, dessa maneira, foi limitada pela natureza destas populações.

As populações nativas, por sua vez, apresentaram maior proporção de locos com aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, os quais foram: Hc 12, Hc 17 e Hc 40 em N1 e Hc 12, Hc 14, Hc 17, Hc 34 e Hc 40 em N2. Apesar de existirem muitos locos com aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg na população N2, isto não significa que esta esteja neste equilíbrio, e que, portanto, apresenta panmixia, tamanho efetivo muito grande, ausência de seleção, mutação e migração. Significa que suas frequências alélicas e genotípicas aderem ao esperado para este equilíbrio, o que pode ocorrer devido ao anulamento entre as forças que causam desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (WHITE et al., 2007).

Quanto ao equilíbrio de ligação, as populações P6, N1 e N2 apresentaram apenas cinco combinações de locos em desequilíbrio de ligação, enquanto que P2 apresentou oito combinações, P1 apresentou 12 e P5 apresentou 14. Como no teste de Fisher os genótipos foram preservados, prevenindo que desequilíbrios dentro de locos afetem a significância do desequilíbrio de combinação de locos, como recomendado por LEWIS & ZAYKIN (2002), não foi observada relação entre os locos que não aderiram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e as combinações de locos em desequilíbrio de ligação. As ocorrências de combinações de locos em desequilíbrio de ligação não foram as mesmas nas populações, tendo variado de uma para outra, o que indica que o desequilíbrio de ligação está associado às populações e não aos locos. Dessa maneira, assim como concluído por MORAES et al. (2007) em situação semelhante, não foi necessário a exclusão de locos das análises.

O maior número de combinação de locos em desequilíbrio de ligação nas populações em plantios P1, P2 e P5 pode estar relacionado com a natureza destas. De acordo com HARTL & CLARK (1997) e ALLENDORF & LUIKART (2007), entre as possíveis causas para o desequilíbrio de ligação está a mistura de populações com frequências gaméticas divergentes. De fato, foi exatamente isso que ocorreu com as populações em plantios de recuperação, as quais foram formadas por conjunto de indivíduos reunidos de diferentes populações nativas.

3.3.3. Estrutura genética espacial

Os resultados obtidos quanto à divergência genética entre populações são apresentados na Tabela 3.6. A divergência genética para o conjunto de todas as populações estudadas foi de 0,139, com intervalo de confiança de 0,1133 a 0,1671.

Tabela 3.6. Valores de divergência genética (θp) entre pares de populações de *H. stigonocarpa* em áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e em áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, MG, e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, com base em 10.000 reamostragens *bootstrap* (entre parênteses).

	P1	P2	P5	P6	N1
P2	0,11 (0,07 a 0,17)				
P5	0,09 (0,05 a 0,15)	0,17 (0,093 a 0,26)			
P6	0,12 (0,07 a 0,17)	0,11 (0,03 a 0,22)	0,07 (0,03 a 0,12)		
N1	0,16 (0,11 a 0,20)	0,18 (0,13 a 0,23)	0,20 (0,13 a 0,26)	0,21 (0,14 a 0,27)	
N2	0,12 (0,07 a 0,17)	0,16 (0,10 a 0,24)	0,13 (0,0573 a 0,2175)	0,13 (0,09 a 0,18)	0,13 (0,03 a 0,24)

O número de migrantes entre populações por geração, parâmetro calculado a partir da divergência genética que indica fluxo gênico histórico entre populações (ALLENDORF & LUIKART, 2007), foi de 1,65 entre N1 e N2, com intervalo de confiança de 0,8 a 9. Este parâmetro foi calculado apenas para as populações nativas visto que diferenças quanto às frequências alélicas entre as populações em plantios de recuperação não se devem à deriva genética ou fluxo gênico.

O número de pares de indivíduos por classe de distância após análise de distribuição espacial dos genótipos foi de 107 a 108 pares na população N1 e 97 a 98 pares na população N2. A análise de correlação espacial por meio de estimativas de coeficientes de coancestria baseados em LOISELLE et al. (1995) indicou que não existe estrutura genética espacial em nenhuma das populações em áreas nativas analisadas (Figuras 3.13 e 3.14). As populações em plantios de recuperação não foram analisadas quanto a isto pois, como os indivíduos foram plantados, qualquer estrutura genética espacial não teria relação com fluxo gênico de sementes ou pólen. Além disso, estas populações estão presentes em áreas pequenas e *H. stigonocarpa* apresenta polinização por morcegos como *Glossophaga*

soricina e *Carollia perspicillata* (GIBBS et al., 1999), os quais apresentam comportamento de forrageamento que promove cruzamentos entre plantas a longas distâncias (HEITHAUS et al., 1975). Dessa maneira, a futura ocorrência de dificuldade de cruzamento entre indivíduos não aparentados devido à presença de estrutura genética espacial dentro destas populações em plantios é pouco provável.

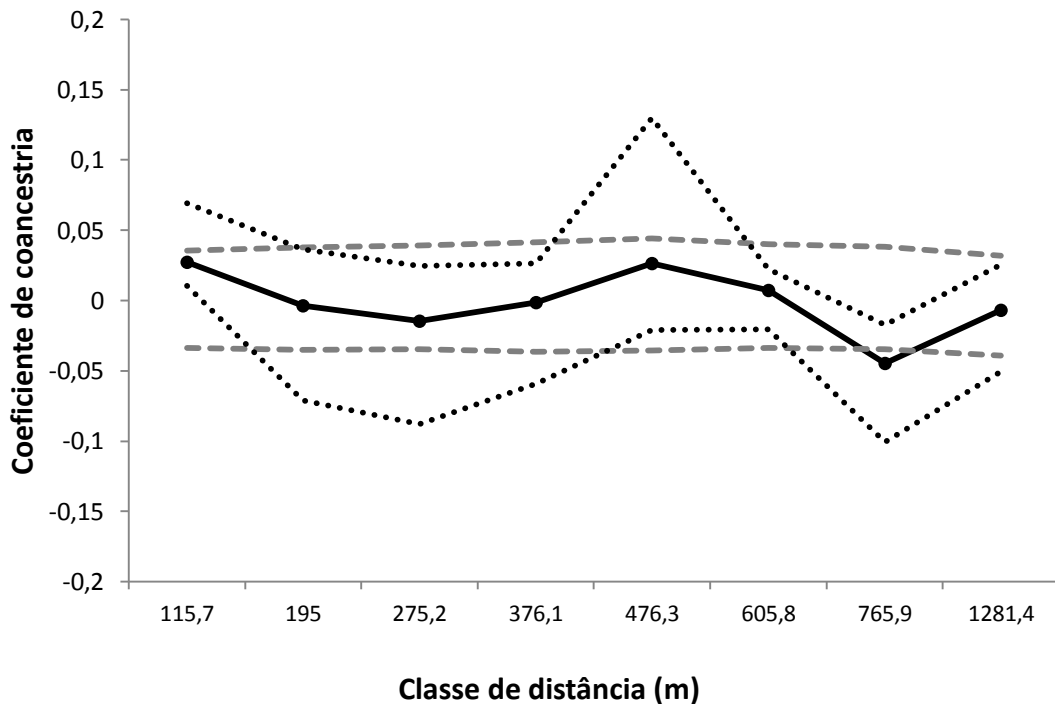


Figura 3.11. Correlograma para coeficiente de coancestria (●) estimado por classes de distâncias, seu intervalo de confiança a 95% (.....) e intervalo de confiança a 95% para teste de ausência de estrutura genética espacial (---) para a população nativa de *H. stigonocarpa* N1, amostrada em Paracatu, MG.

A correlação espacial para a população N1 mostra que o coeficiente de coancestria médio não foi significativamente diferente de zero em quase todas as distâncias, a não ser pela distância de 765,9 metros, em que apresentou valor negativo e significativo, porém muito próximo à faixa que indica ausência de estrutura genética espacial. Já para a população N2, pode ser observado que o coeficiente de coancestria médio não foi significativamente diferente de zero em nenhuma distância. Assim, esses resultados indicam que estas populações apresentam distribuição espacial dos genótipos aleatória, não exibindo padrão de isolamento a distância, em que árvores mais próximas entre si são mais aparentadas e árvores distantes entre si são menos aparentadas (WRIGHT, 1943).

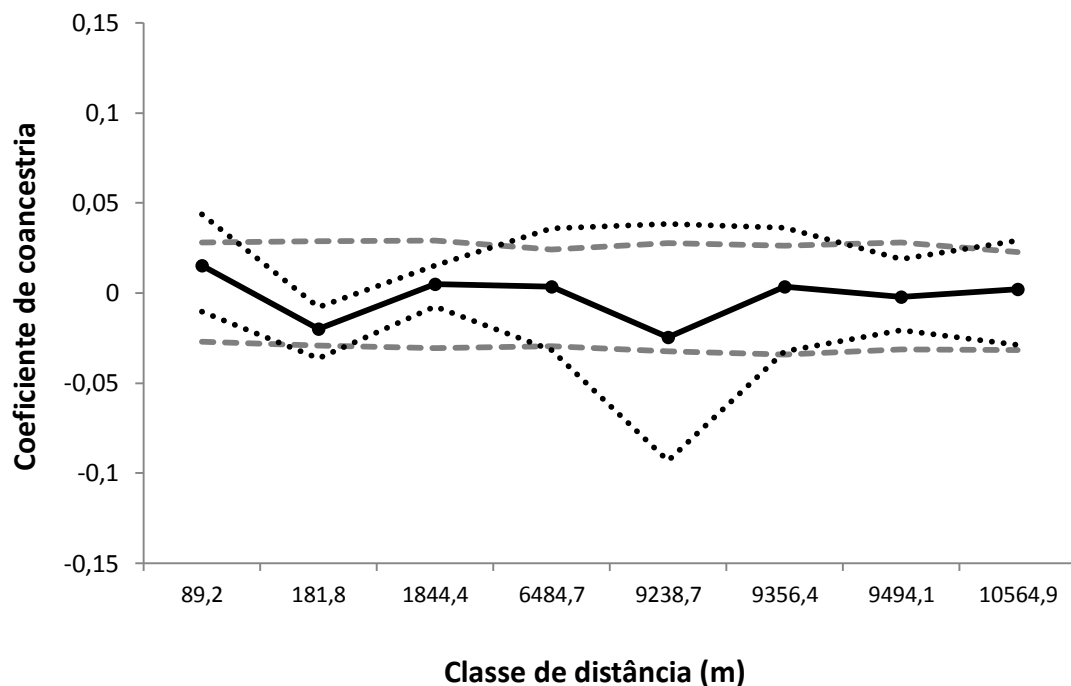


Figura 3.12. Correlograma para coeficiente de coancestria (●) estimado por classes de distâncias, seu intervalo de confiança a 95% (.....) e intervalo de confiança a 95% para teste de ausência de estrutura genética espacial (---) para a população nativa de *H. stigonocarpa* N2, amostrada em Paracatu, MG.

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Variabilidade genética

Comparando os resultados obtidos quanto aos números de alelos, heterozigosidades esperadas, heterozigosidades observadas e coeficientes de endogamia com outros trabalhos sobre a variabilidade genética de *H. stigonocarpa* através de marcadores SSR (Tabela 3.7), é possível observar que os resultados aqui obtidos se encontram dentro do padrão para populações desta espécie. As pequenas divergências observadas quanto ao número médio de alelos por loco podem estar relacionadas ao tamanho amostral, visto que este parâmetro é afetado pelo tamanho amostral (KALINOWSKI, 2004).

O fato de todas as populações nos plantios de recuperação analisadas terem apresentado maior número médio de alelos por loco do que as populações em áreas nativas indica que existe maior variabilidade genética entre indivíduos nas populações nos plantios de recuperação do que nas populações em áreas nativas. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que as coletas das sementes a serem implantadas nos plantios de

recuperação foram realizadas em diferentes áreas naturais. Isto deve ter propiciado a amostragem de maior número de alelos, visto que, de acordo com FALK et al. (2001), a variação genética capturada aumenta a medida que diferentes populações são adicionadas à amostragem. Esses resultados indicam que as coletas de sementes foram eficientes em captar a variabilidade genética existente localmente em populações nativas de *H. stigonocarpa*.

Tabela 3.7. Local de estudo, tamanho amostral (n), número de alelos médio por loco (A), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (f) observados no presente trabalho e em outros trabalhos realizados sobre variabilidade genética de populações de *H. stigonocarpa* através de marcadores microssatélites.

Trabalho	Local	n	A	He	Ho	f
Presente trabalho	MG					
P1		36	8,9	0,795	0,624	0,218
P2		39	7	0,663	0,532	0,2
P5		34	8	0,664	0,45	0,326
P6		37	7,9	0,66	0,492	0,258
N1		33	5,4	0,495	0,577	-0,169
N2		35	6,3	0,572	0,501	0,127
Moraes et al. (2007)	MS					
Progênie		264	11,7	0,623	0,367	0,411
Adultos		42	7	0,634	0,441	0,304
Ciampi et al. (2008)	BA e MG	40	6,4	0,601	0,389	0,355
Moreno (2009)	SP	18 a 69	4,7 a 10,7	0,560 a 0,784	0,583 a 0,66	-0,126 a 0,177
Moraes & Sebbenn (2011)	MS	205	10,3	0,212 a 0,850	0,188 a 0,685	-0,037 a 0,244

Quanto à variabilidade genética dentro de indivíduos, as populações em plantios de recuperação apresentaram menor proporção de heterozigotos com relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg do que as populações em áreas nativas, o que é demonstrado claramente pelos coeficientes de endogamia positivos e consistentes em todas as populações em plantios. Esta relação pode ser entendida pelo fato de que a endogamia não altera as frequências alélicas da população, não afetando imediatamente a heterozigosidade esperada, porém aumenta a proporção de homozigotos em todos os locos (FREELAND, 2005), podendo o efeito da endogamia ser definido como a diferença na heterozigosidade com relação àquela de uma população panmítica (HARTL & CLARK, 1997). Assim, os coeficientes de endogamia aqui estimados indicam que as populações em plantios de recuperação são endogâmicas, apresentando excesso de homozigotos (GILLESPIE, 1998).

Considerando que o tamanho efetivo quantifica a taxa de perda de heterozigosidade da população em comparação a uma população ideal, sendo calculado com base no coeficiente de endogamia (GILLESPIE, 1998; RYMAN & LAIKRE, 1991), os menores tamanhos efetivos por indivíduo nas populações em plantios de recuperação se devem aos maiores coeficientes de endogamia e, assim, à maior proporção de homozigotos nestas. Contudo, apesar dos indivíduos nas populações em plantios de recuperação apresentarem menor representatividade genética do que aqueles nas populações nativas, P1, P2 e P5 possuem tamanhos efetivos suficientemente grandes para a conservação *in situ* em curto prazo, porém não para a conservação em longo prazo.

O fato de todas as populações nos plantios de recuperação terem apresentado coeficientes de endogamia altos e consistentes pode ter relação com o controle ambiental associado ao viveiro onde as mudas implantadas nos plantios foram produzidas. Diferentemente de ambientes naturais, onde a população está sujeita à seleção natural, o ambiente controlado em viveiro de produção de mudas possibilita maiores porcentagens de germinação de sementes e sobrevivência de plântulas, diminuindo a seleção natural (NETO et al., 2005). Progênies de espécies arbóreas tropicais tendem a apresentar maior coeficiente de endogamia do que os adultos, o que está relacionado à seleção contra homozigotos ao longo do tempo e depressão endogâmica nestas espécies (KAGEYAMA et al., 2003). Vários trabalhos com espécies arbóreas, incluindo *H. stigonocarpa*, indicam a existência de seleção contra homozigotos (SAMPSON et al., 1989; KENNINGTON & JAMES, 1997; MILLAR et al., 2000; SEBBENN et al., 2000; GRIBEL & GIBBS, 2002; HUFFORD & HAMRICK, 2003; RIBAS & KAGEYAMA, 2004b; NAITO et al., 2005; MORAES & SEBBENN, 2011). Além disso, GIBBS et al. (1999) observaram que *H. stigonocarpa* apresenta controle pós-zigótico de autopolinização, o que sugere depressão por endogamia nesta espécie.

Assim, existe a possibilidade de indivíduos homozigotos nestas populações em plantios de recuperação serem eliminados ao longo do tempo devido à seleção natural, o que representa potenciais perdas de alelos. Se o número de indivíduos for drasticamente reduzido, as populações em plantios de recuperação podem sofrer o efeito fundador (FALK et al., 2001), ou seja, podem ser formadas por poucos alelos (ALLENDORF & LUIKART, 2007), se tornando populações com baixa variabilidade genética. Isto resultará, por sua vez, em maior ocorrência de endogamia, a qual pode reduzir os níveis de adaptação e desempenho dos indivíduos, diminuindo todas as medidas de diversidade genética

através de aumento das taxas de mortalidade (HARTL & CLARK, 1997; FREELAND, 2005). Essa situação pode resultar na entrada destas populações no ‘vórtex da extinção’, em que a existência de reduzida variabilidade genética causa redução da habilidade de adaptação a diferentes condições ambientais, o que leva a novas reduções no tamanho efetivo populacional, e assim por diante (GILPIN & SOULÉ, 1986).

Nesse sentido, é necessário que sejam realizados tratamentos silviculturais, adubações, controle de pragas e doenças e irrigação conforme o necessário, de maneira que as condições para sobrevivência dos indivíduos implantados nos plantios sejam melhoradas ao máximo. Caso as condições ambientais não sejam propícias para a sobrevivência de indivíduos homozigotos, com possivelmente menor vigor, a variabilidade genética nestas populações poderá ser parcialmente perdida, sendo possível até mesmo a extinção destas populações. Isto significa desperdício de esforços realizados e de recursos utilizados para implantação destes plantios de recuperação.

Apesar disso, existe forte tendência de diminuição da proporção de homozigotos nas populações em plantios de recuperação nas próximas gerações, visto que existe alta variabilidade genética entre os indivíduos, o que pode ser amplificado através de cruzamentos. Isto possibilitaria a existência de maior heterozigosidade observada, reduzindo, assim, estimativas de coeficientes de endogamia e probabilidades de ocorrência de depressão endogâmica, além de aumentar os tamanhos efetivos por indivíduo nas populações.

Para isto, entretanto, é necessário que os indivíduos não apenas sobrevivam, mas se reproduzam por cruzamentos. Assim, é imprescindível que os polinizadores da espécie, os quais são principalmente morcegos (GIBBS et al., 1999), estejam presentes na área, para que ocorram cruzamentos e não autopolinização. SILVA-MONTELLANO & EGUIARTE (2003a, 2003b) encontraram que populações de *Agave lechuguilla* com menores números de polinizadores apresentaram menores valores de heterozigosidade observada, sendo concluído que a autopolinização é mais comum em populações localizadas em áreas com menor número de polinizadores. Assim, a presença dos polinizadores de *H. stigonocarpa* nestas populações é muito importante, o que pode ser potencializado pela manutenção de áreas naturais e corredores ecológicos próximos a estas áreas de plantios.

Apesar de ter sido observado nas populações em plantios problemas associados à baixa heterozigosidade em comparação à panmixia, estas populações possuem maior

variabilidade entre indivíduos do que as populações nativas. A heterozigosidade fornece boa medida da capacidade da população em responder à seleção em curto prazo, porém o número de alelos é importante para a resposta em longo prazo à seleção e sobrevivência de populações e espécie (ALLENDORF, 1986). De acordo com PETIT et al. (1998), o número de alelos, o qual se constitui numa medida de diversidade direta e de óbvio interesse na genética da conservação, deveria ter prioridade máxima como parâmetro para análise do estado de conservação de populações, por ser um bom indicador de mudanças demográficas passadas. Entretanto, o fato do número de alelos ser maior nos plantios de recuperação nada significa se os indivíduos com elevada homozigosidade nos plantios não sobreviverem.

3.4.2. Estrutura genética espacial

Segundo FREELAND (2005), valores de divergência genética (θp) podem ser classificados em três níveis: de 0 a 0,05 indicam pequena diferenciação genética; de 0,05 a 0,25, diferenciação moderada; e valores maiores do que 0,25 indicam níveis pronunciados de diferenciação genética. HARTL & CLARK (1997) fizeram uma classificação muito semelhante, porém subdividiram o segundo nível definido por FREELAND (2005) e consideraram que valores entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação moderada e de 0,15 a 0,25, diferenciação muito grande.

Considerando a classificação de FREELAND (2005), todos os pares de populações estudadas de *H. stigonocarpa* apresentaram divergência genética moderada, porém considerando a classificação de HARTL & CLARK (1997), as duplas de populações P1 e N1, P2 e P5, P2 e N1, P2 e N2, P5 e N1 e P6 e N1 apresentaram divergência genética grande e as demais duplas apresentaram divergência genética moderada. Já o valor de divergência genética observado para o conjunto de todas as populações pode ser considerado, de acordo com ambas as classificações, moderado. Assim, tendo em vista que parâmetros como θp são mais do que medidas de diferenciação genética, podendo ser interpretados como a proporção de diversidade genética devido à diferenças de frequências alélicas entre populações (HOLSINGER & WEIR, 2009), estes resultados indicam que existe variabilidade genética de moderada a alta entre as populações estudadas de *H. stigonocarpa*.

O número de migrantes por geração estimado entre as populações N1 e N2 é considerável, principalmente tendo em vista que foram analisadas apenas duas populações e que pode ter ocorrido fluxo gênico a partir de outras populações locais. Além disso, de acordo com SLATKIN (1987), um mínimo de fluxo gênico é capaz de prevenir a fixação completa de alelos em populações, apesar de não prevenir diferenciação por deriva genética. Assim, este resultado indica que ocorreu no passado fluxo gênico considerável entre estas populações nativas. Entretanto, considerando que a espécie possui ciclo de vida longo e que o município de Paracatu passou por intensas transformações na paisagem natural (FELFILI et al., 1992; SCOLFORO & CARVALHO, 2006; NERI et al., 2011), este retrato do fluxo gênico histórico pode não condizer com a situação quanto ao fluxo gênico atual entre estas populações.

Quanto à ausência de estrutura genética espacial observada dentro das populações nativas de *H. stigonocarpa*, outros estudos com espécies arbóreas e arbustivas registraram o mesmo padrão (DEWEY & HEYWOOD, 1988; HAMRICK et al., 1993; GANDARA, 1996; MALTEZ, 1997; SEBBENN, 1997; SOUZA, 1997; MORAES, 1997; DEGEN et al., 2001; NG et al., 2006; SATO et al., 2006; REIS et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010). Cabe ressaltar, contudo, que a estrutura genética espacial não foi detectada apenas dentro das populações. Considerando que valores significativos de divergência genética podem indicar padrão de isolamento por distância (LOISELLE et al., 1995), os valores de θp observados sugerem que o conjunto estudado de populações de fato possua estruturação genética espacial, a qual, entretanto, não foi observada dentro das populações nativas.

A ausência de estrutura genética observada dentro das populações de *H. stigonocarpa* em áreas nativas pode ter relação com a natureza dos agentes polinizadores desta espécie, morcegos (GIBBS et al., 1999), e dos agentes dispersores de sementes, mamíferos (SILVA-JÚNIOR, 2005). Os mecanismos de dispersão de sementes e de pólen têm impacto direto na estrutura genética de populações, sendo que espécies com dispersão mais próxima à árvore matriz apresentam estrutura genética espacial mais forte e espécies com dispersão realizada por animais com maior mobilidade apresentam menor estruturação espacial (HAMRICK et al., 1993). De acordo com HEITHAUS et al. (1975), as principais espécies de morcegos que polinizam *H. stigonocarpa* apresentam comportamento de forrageamento que promove reprodução cruzada entre indivíduos em longas distâncias. Isso é corroborado por MORAES & SEBBENN (2011), os quais observaram que a dispersão de pólen entre indivíduos isolados de *H. stigonocarpa* alcançou distâncias de até

7.353 metros, e por MORENO et al. (2009), que observaram haplótipos de indivíduos desta espécie distantes uns dos outros em até 7.000 metros.

Contudo, MORAES et al. (2007), DEFAVARI et al. (2009) e MORENO et al. (2009) e observaram estrutura genética espacial em populações de *H. stigonocarpa*, com valores significativos de coeficientes de coancestria de Loiselle (ou Índice de Moran, no caso do último trabalho) em até 500 ($\theta_{xy} = 0,157$), 5 e 750 metros de distância, respectivamente. Esta aparente discrepância pode ser explicada pelo fato de que a estruturação genética espacial é afetada por inúmeros fatores ambientais e ecológicos. Entre estes podem ser citados: características da paisagem, heterogeneidade ambiental, densidade populacional, morfologia floral, sistema reprodutivo, mecanismos de polinização e dispersão de sementes, características qualitativas e quantitativas dos agentes polinizadores e dispersores de sementes presentes na área, ocorrência de eventos históricos, interações ecológicas intra e inter-específicas e relações ecológicas geneticamente influenciadas (LOVELESS & HAMRICK, 1984; HEYWOOD, 1991; HAMRICK et al., 1993; MANEL et al., 2003; VEKEMANS & HARDY, 2004).

Os resultados quanto à distribuição espacial dos genótipos nas populações nativas N1 e N2 sugerem que o uso de parâmetros de distância entre árvores matrizes para coleta de sementes nestas seja desnecessário. Assim, recomenda-se que a coleta de sementes nestas populações seja feita de maneira aleatória. Cabe ressaltar, entretanto, que este trabalho não teve como objetivo definir outros parâmetros para a coleta de sementes nas populações nativas estudadas além da distância mínima entre árvores-matrizes. Tendo isso em vista, é de extrema importância que a coleta de sementes se baseie na amostragem do maior número possível não apenas de indivíduos, mas também de populações (BROADHURST et al., 2008) e que sejam coletados número de sementes aproximadamente igual por indivíduo amostrado (VENCOVSKY, 1987; VENCOVSKY et al., 2007). Além disso, deve ser evitada coleta de sementes em árvores isoladas de *H. stigonocarpa*, devido à possibilidade destas apresentarem maior proporção de sementes endogâmicas (MORAES et al., 2007).

3.5. CONCLUSÃO

As populações de *H. stigonocarpa* em plantios de recuperação apresentaram maior variabilidade genética entre indivíduos do que as populações em áreas nativas, o que sugere que a coleta de sementes foi eficiente em captar a diversidade genética da espécie localmente. Além disso, a não ser pela área de plantio P6, cujos dados de sobrevivência não foram coletados devido a sua recente implantação, todas populações em plantios de recuperação apresentaram tamanhos demográficos muito próximos ou maiores do que o tamanho mínimo viável para sua conservação *in situ* em curto prazo. Entretanto, foi observada baixa proporção de heterozigotos com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações em plantio e, assim, coeficientes de endogamia positivos e consistentes, o que aponta para a possibilidade de ocorrência de problemas associados à adaptação e resposta à seleção natural em curto prazo dos indivíduos e, dessa maneira, problemas de auto-sustentabilidade destas populações. Devido à alta variabilidade genética entre indivíduos, a baixa proporção de heterozigotos observada nas populações em plantios tende a diminuir com ocorrência de reprodução cruzada. Nesse sentido, é necessário que ocorra manejo intensivo dos plantios, para que as condições sejam propícias à sobrevivência dos indivíduos, e que ocorra manutenção de áreas nativas próximas aos plantios, de maneira a propiciar a existência dos polinizadores da espécie na região e, assim, permitir reprodução cruzada entre os indivíduos. Com relação à coleta de sementes para uso em plantios de recuperação de áreas degradadas, ambas populações nativas de *H. stigonocarpa* estudadas podem ser utilizadas para este fim, visto que apresentaram variabilidade genética considerável, não sendo necessário adoção de distância mínima entre árvores-matrizes nestas populações. Contudo, devem ser respeitadas recomendações convencionais como amostragem de grande número de indivíduos e populações e realização do controle gamético feminino durante as atividades de coleta de sementes.

4. VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Dipteryx alata* Vogel EM ÁREAS NATIVAS E EM PLANTIOS DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS EM PARACATU, MG

4.1. INTRODUÇÃO

A partir do momento em que a recuperação de áreas degradadas se tornou necessária frente as pressões antrópicas e se desenvolveu como ciência, surgiu a necessidade de se revisar os parâmetros utilizados na análise do sucesso de projetos de recuperação, visto que o conhecimento sobre genética de populações aumentou significativamente nas últimas décadas (BROADHURST et al., 2008). Considerando que a evolução, e não apenas a ecologia, explica a persistência da espécie, a compreensão do papel da genética na ecologia de populações deve servir como base para as ações de recuperação (RICE & EMERY, 2003). A variabilidade genética a ser inserida numa área em recuperação é considerada por BRANCALION et al. (2009) e RODRIGUES et al. (2009) como um dos futuros desafios da ecologia da restauração. A importância desta questão é evidenciada, ainda, pela criação da área de pesquisa Genética da Restauração (LESICA & ALLENDORF, 1999; FALK et al., 2001; HUFFORD & MAZER, 2003; RICE & EMERY, 2003; MCKAY et al., 2005; RAMP et al., 2006; BROADHURST et al., 2008; MENGES, 2008; BOUZAT et al., 2009).

A recuperação de áreas degradadas geralmente requer a coleta de indivíduos ou propágulos de uma ou mais fontes para criar populações restauradas, cujo êxito é um dos componentes do sucesso das ações de recuperação (HUFFORD & MAZER, 2003; RAMP et al., 2006; MENGES, 2008). Na maior parte dos casos, entretanto, a seleção destas fontes de propágulos se baseia apenas na localidade e disponibilidade ao invés de conhecimento sobre níveis e distribuição de variação genética de populações e potenciais fontes (RAMP et al., 2006). Essa situação pode acarretar em coleta de propágulos com baixa diversidade genética e na implantação de populações em plantios de recuperação sem viabilidade genética, que em longo prazo poderá comprometer populações em específico, ou mesmo todo o ecossistema em restauração. Tal questão possui especial importância no caso de plantios de recuperação que utilizam espécies nativas e visam implantação de ecossistemas

com biodiversidade similar aos ecossistemas nativos, como proposto pelo Modelo Nativas do Bioma (FELFILI et al., 2006).

Baru (*Dipteryx alata* Vogel.) é árvore nativa do Cerrado da família Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae) (CARVALHO, 2003) utilizada em plantios de recuperação de áreas degradadas (FELFILI et al., 2006). É diplóide, hermafrodita e basicamente alógama, podendo, contudo, apresentar autopolinização em situações de baixa densidade populacional (OLIVEIRA & SIGRIST, 2008; TARAZI et al., 2010). Possui importância econômica principalmente devido à sua madeira, altamente resistente ao ataque de organismos xilófagos, e sua castanha, bastante nutritiva (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004; SILVA-JÚNIOR, 2005). Apesar de sua importância econômica e ecológica, grandes populações de *D. alata* foram destruídas em ecossistemas nativos (POTT & POTT, 2003), sendo a recuperação de áreas degradadas importante estratégia para a conservação desta espécie. Por apresentar bom crescimento, baixa exigência de adubação e de manutenção, alta produção de massa foliar e ser espécie chave na sustentação da fauna silvestre devido a seus frutos serem um dos poucos que apresentam polpa carnosa durante a estação seca no Cerrado, seu uso é recomendado para recuperação de áreas degradadas (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004).

Este capítulo tem como objetivo comparar a variabilidade genética de populações de *D. alata* em plantios de recuperação de áreas degradadas e em áreas nativas de Cerrado sentido restrito, amostradas em Paracatu - MG, visando avaliar se as populações em plantios de recuperação são geneticamente auto-sustentáveis.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a variabilidade genética de quatro populações de *D. alata* em plantios de recuperação de áreas degradadas em comparação com duas populações da espécie em áreas nativas de Cerrado sentido restrito, no município de Paracatu – MG;
- Elaborar recomendações técnicas para coleta de sementes em populações de *D. alata* em duas áreas nativas de Cerrado sentido restrito, no município de Paracatu – MG, a partir da análise da distribuição espacial dos genótipos nestas populações, de maneira a propiciar a amostragem de sementes com variabilidade genética para uso em projetos de recuperação de áreas degradadas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Áreas de estudo, amostragem das populações e coleta de material

Foram analisadas quatro áreas de plantios de recuperação de áreas degradadas (P1, P2, P5 e P6) e duas áreas nativas de Cerrado sentido restrito (N1 e N2), todas localizadas próximas ao município de Paracatu, MG. A descrição destas áreas de estudo podem ser conferidas no item 3.2.1. Em cada área foi amostrada uma população de *D. alata*. A amostragem das populações e coleta de material foi realizada da maneira descrita no item 3.2.2. Foram amostrados de 38 a 48 indivíduos em cada população de *D. alata*, num total de 251 indivíduos, sendo 168 em plantios de recuperação e 83 em áreas nativas.

4.2.2. Procedimentos laboratoriais

A extração e quantificação de DNA e amplificação e genotipagem de locos microssatélites foram realizados como descrito no item 3.2.3. Contudo, foram utilizados *primers* desenvolvidos para *Dipteryx odorata* (VINSON et al., 2009) e transferidos para *D. alata* (TARAZI et al., 2010) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. *Primers* para *D. alata*, temperaturas de anelamento utilizadas e amplitudes alélicas obtidas.

<i>Primer</i>	Seqüência (F: <i>Foward</i> ; R: <i>Reverse</i>)	Temperatura de anelamento (°C)	Amplitude alélica (pb)
Do 05	F:AGGGAGGCCAAGAAGTAAGC R:AAGGTTTGAAGTTGAAGCTTGG	60	244 – 246
Do 06	F: AGCGGTGAAAAGACCATAGC R: CAACGATAAGATTCTCCA	60	187 – 195
Do 08	F: AGATCAGCGGACAAAGGTCT R: GTAATGTTGTGCCACTCTTG	58	176 – 192
Do 20	F: GCCCATCTAAGCGCATTATT R: AGTGGAAGGGTGGATTGATG	58	170 – 184
Do 24	F: AACGCAGGATCTAGCCAAAA R: CTTCTCGCTGTTGTGCACTC	60	174 – 182
Do 25	F: AAATGCAAAACGGAAGAGGA R: CCCCTGAAGGAGACTTCGAT	56	182 – 214
Do 35	F: AACCAAAGCAAACAAAGCA R: GCTGAGAAAGGGGAATGCAG	60	210 – 220

A reação de PCR foi composta pela combinação de reagentes descrita no item 3.2.3 e o programa utilizado para a reação consistiu de: 95°C por cinco minutos; 30 ciclos compostos por 95°C por um minuto, temperatura de anelamento (Tabela 4.1) por um minuto e 72°C por um minuto; e extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.2.3. Análise de dados

Foi realizada a caracterização da variabilidade genética intra e interpopulacional, teste de aderência das frequências genotípicas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e dos locos ao equilíbrio de ligação, detecção de alelos nulos, cálculo dos tamanhos efetivos e tamanhos mínimos viáveis das populações, análise da distribuição espacial dos genótipos das populações nativas e cálculo do fluxo gênico entre populações nativas. Estas análises estatísticas foram efetuadas de acordo com as descrições apresentadas no item 3.2.4. Além destas análises, foi realizada a detecção de gargalos genéticos nas populações nativas de *D. alata*.

Detecção de gargalos genéticos nas populações nativas

A detecção de reduções recentes nos tamanhos efetivos das populações nativas de *D. alata* foi efetuada através do *software* BOTTLENECK (PIRY et al., 1999). Esse *software* se baseia no fato de que populações que sofreram reduções recentes no seu tamanho efetivo apresentam redução do número de alelos e da heterozigosidade esperada, porém o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade esperada (MARUYAMA & FUERST, 1985; ALLENDORF, 1986; LUIKART & CORNUET (1998), FREELAND, 2005). Assim, em população que passou por gargalo genético recentemente, a heterozigosidade esperada é maior do que a heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação e deriva, a qual é calculada a partir do número de alelos, assumindo que a população está em equilíbrio (LUIKART & CORNUET, 1998; PIRY et al., 1999).

Foram utilizados os modelos IAM (Modelo de Alelos Infinitos) (KIMURA & CROW, 1964), SMM (Modelo de Passos de Mutação) (OHTA & KIMURA, 1973) e TPM (Modelo de Duas Fases) (DI RIENZO et al., 1994). Não existe um modelo definitivo que explique o processo de mutação de microssatélites, sendo que IAM e SMM descrevem situações extremas e TPM é intermediário a estes e, assim, mais adequado à maioria dos dados de SSR (CORNUET & LUIKART, 1996; DI RIENZO et al., 1994). Para determinar se a população exibe número significativo de locos com excesso de heterozigosidade

esperada, foi realizado o teste de significância de Wilcoxon com 1000 iterações, visto que foram utilizados menos de 20 locos microssatélites, conforme recomendado por LUIKART & CORNUET (1998).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Variabilidade genética

O microssatélite Do 08 apresentou amplificação de locos duplicados. Ambos os locos, porém, se mostraram polimórficos e com intervalos de ocorrência de alelos distantes o suficiente para permitir diferenciar os alelos em cada loco. Assim, estes dois locos foram incluídos nas análises genéticas e chamados de Do 08a e Do 08b. A duplicação de locos é uma característica normal da evolução genômica, podendo a cópia duplicada apresentar divergência funcional da cópia original, situação que propicia a evolução de novas funções gênicas, ou se tornar pseudogene, sem função (WALSH, 1995). Outros autores, como SANSALONI (2008), também consideraram locos duplicados em suas avaliações.

O tamanho amostral nas populações de *D. alata* variou de 36,62 a 44,37 (Tabela 4.2). Neste caso, todos os tamanhos amostrais foram maiores do que 30, e, assim, suficientemente grandes para a estimativa de frequências alélicas dentro das populações (BERG & HAMRICK, 1997), tendo em vista que os marcadores utilizados são codominantes. Os locos Do 25 e Do 08a apresentaram o menor (204) e maior (247) tamanho amostral em relação ao tamanho amostral total, de 251 indivíduos (Tabela 4.3).

As populações P1, P2, P5, P6, N1 e N2 apresentaram, respectivamente, 3,25; 3,12; 3; 2,75; 2,87 e 2,5 alelos por loco (Tabela 4.2). Apesar do número de alelos ser afetado pelo tamanho amostral (KALINOWSKI, 2004), as diferenças de tamanhos amostrais foram pequenas, permitindo comparação entre populações quanto a este parâmetro. Diferentemente das populações de *H. stigonocarpa* (Capítulo 3), as diferenças entre as populações de *D. alata* quanto ao número de alelos por loco foram relativamente pequenas. Considerando o número total de alelos por população, entretanto, é possível constatar que P1 possui 30% a mais de alelos do que N2 (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Tamanho amostral (n), número de alelos (A), alelos privados (Ap), heterozigosidade máxima ($Hmáx$), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), relação entre heterozigosidades esperada e máxima ($He/Hmáx$), relação entre heterozigosidades observada e esperada (Ho/He) e coeficiente de endogamia (f) das populações de *D. alata* nas áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e nas áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, MG, para os oito locos avaliados.

Área	Loco	n	A	Ap	Hmáx	He	Ho	He/Hmáx	Ho/He	f	
P1	Do 05	40	2	0	0,500	0,378	0,500	0,759	1,317	-0,322	
	Do 06	40	3	0	0,667	0,512	0,70	0,768	1,368	-0,374	
	Do 08a	40	2	0	0,500	0,240	0,275	0,480	1,145	-0,147	
	Do 08b	40	3	0	0,667	0,205	0,225	0,307	1,099	-0,100	
	Do 20	36	5	0	0,800	0,536	0,750	0,670	1,398	-0,406	
	Do 24	39	4	0	0,750	0,706	0,667	0,941	0,945	0,056	
	Do 25	24	4	2	0,750	0,658	0,500	0,877	0,760	0,244	
	Do 35	34	3	0	0,667	0,469	0,647	0,704	1,379	-0,387	
	Total			26	2						
	Média	36,62	3,25			0,692	0,463	0,533	0,669	1,151	-0,154
IC										-0,348 a 0,037	
P2	Do 05	47	2	0	0,500	0,500	0,894	0,999	1,788	-0,804	
	Do 06	47	3	0	0,667	0,495	0,787	0,743	1,589	-0,600	
	Do 08a	47	2	0	0,500	0,414	0,574	0,828	1,388	-0,394	
	Do 08b	47	3	1	0,667	0,042	0,043	0,063	1,005	-0,005	
	Do 20	43	5	0	0,800	0,575	0,698	0,718	1,214	-0,217	
	Do 24	42	4	0	0,750	0,663	0,905	0,885	1,364	-0,370	
	Do 25	39	3	1	0,667	0,519	0,333	0,779	0,642	0,361	
	Do 35	43	3	0	0,667	0,493	0,791	0,739	1,605	-0,616	
	Total			25	2						
	Média	44,37	3,12			0,680	0,463	0,628	0,680	1,357	-0,363
IC										-0,588 a -0,087	
P5	Do 05	37	2	0	0,500	0,498	0,865	0,995	1,738	-0,756	
	Do 06	37	4	0	0,750	0,524	0,865	0,699	1,650	-0,665	
	Do 08a	38	2	0	0,500	0,489	0,816	0,979	1,667	-0,682	
	Do 08b	38	3	0	0,667	0,077	0,079	0,116	1,018	-0,018	
	Do 20	37	2	0	0,500	0,373	0,486	0,746	1,304	-0,309	
	Do 24	36	3	0	0,667	0,432	0,417	0,648	0,965	0,036	
	Do 25	36	2	0	0,500	0,430	0,278	0,861	0,645	0,359	
	Do 35	37	6	0	0,833	0,589	0,703	0,706	1,194	-0,197	
	Total			24	0						
	Média	37,00	3,00			0,667	0,427	0,563	0,640	1,321	-0,327
IC										-0,579 a -0,037	

Tabela 4.2. (continuação).

Área	Loco	n	A	Ap	Hmáx	He	Ho	He/Hmáx	Ho/He	f	
P6	Do 05	42	2	0	0,500	0,465	0,714	0,929	1,537	-0,547	
	Do 06	42	3	0	0,667	0,473	0,714	0,710	1,510	-0,519	
	Do 08a	42	2	0	0,500	0,450	0,667	0,900	1,482	-0,491	
	Do 08b	42	2	0	0,500	0,070	0,071	0,139	1,025	-0,025	
	Do 20	42	2	0	0,500	0,450	0,667	0,900	1,482	-0,491	
	Do 24	40	4	0	0,750	0,594	0,550	0,792	0,926	0,075	
	Do 25	42	2	0	0,500	0,465	0,333	0,929	0,717	0,285	
	Do 35	40	5	0	0,800	0,506	0,650	0,633	1,284	-0,288	
	Total			22	0						
	Média	41,50		2,75		0,636	0,434	0,546	0,682	1,258	-0,262
	IC										-0,478 a -0,028
N1	Do 05	33	2	0	0,500	0,357	0,454	0,713	1,274	-0,280	
	Do 06	40	3	0	0,667	0,538	0,650	0,806	1,209	-0,212	
	Do 08a	42	2	0	0,500	0,354	0,452	0,708	1,277	-0,281	
	Do 08b	39	2	0	0,500	0,226	0,256	0,453	1,132	-0,134	
	Do 20	39	5	1	0,800	0,557	0,718	0,696	1,289	-0,294	
	Do 24	38	4	0	0,750	0,590	0,816	0,787	1,381	-0,389	
	Do 25	33	2	0	0,500	0,496	0,366	0,992	0,733	0,270	
	Do 35	39	3	0	0,667	0,505	0,846	0,758	1,675	-0,690	
	Total			23	1						
	Média	37,87		2,87		0,652	0,453	0,569	0,694	1,258	-0,262
	IC										-0,437 a -0,061
N2	Do 05	35	2	0	0,500	0,448	0,657	0,895	1,468	-0,478	
	Do 06	38	3	0	0,667	0,579	0,737	0,869	1,272	-0,277	
	Do 08a	38	2	0	0,500	0,501	0,895	1,002	1,786	-0,805	
	Do 08b	38	4	1	0,750	0,357	0,421	0,477	1,178	-0,180	
	Do 20	40	2	0	0,500	0,461	0,650	0,921	1,411	-0,418	
	Do 24	38	3	0	0,667	0,532	0,816	0,798	1,534	-0,545	
	Do 25	30	2	0	0,500	0,398	0,533	0,795	1,341	-0,349	
	Do 35	38	2	0	0,500	0,498	0,868	0,996	1,744	-0,762	
	Total			20	1						
	Média	36,87		2,50		0,600	0,472	0,697	0,786	1,478	-0,488
	IC										-0,632 a -0,348

Intervalo de Confiança (IC) = 95%, com base em 10.000 reamostragens *bootstrap*.

O número de alelos privados foi relativamente baixo em todas populações: P1 e P2 apresentaram dois alelos privados cada, N1 e N2 apresentaram apenas um, e P5 e P6, nenhum (Tabela 4.2). Quanto à proporção de alelos raros com relação ao número total de alelos por população, foram observados 23% de alelos raros na população P1 (Figura 4.1), 32% em P2 (Figura 4.2), 21% em P5 (Figura 4.3), 23% em P6 (Figura 4.4), 13% em N1 (Figura 4.5) e 10% em N2 (Figura 4.6). Estas proporções foram inferiores àquelas observadas para as populações estudadas de *H. stigonocarpa*, as quais variaram de 37 a 47% (Capítulo 3).

Ocorreram variações quanto às distribuições de frequências alélicas entre populações e locos (Figuras 4.1 a 4.6). Muitas das frequências foram superior a 0,5, o que está relacionado com o baixo número de alelos nestas populações. Alguns histogramas apresentaram predominância de um alelo com frequência superior a 0,7 como aqueles dos locos Do 05, Do 08a, Do 08b para a população P1; Do 08a e Do 08b para P2; Do 08b, Do 20, Do24 e Do25 para P5; Do 8b para P6; Do 05, Do 08a, Do 08b para N1; e Do 08b e Do 25 para N2. Estes locos nestas populações apresentaram os menores valores de heterozigidade esperada, visto que este parâmetro é calculado com base nas frequências alélicas (ALLENDORF & LUIKART, 2007).

Tabela 4.3. Média do tamanho amostral (n), número de alelos (A), número de alelos privados (Ap) encontrados nas populações, heterozigidade máxima ($Hmáx$), heterozigidade esperada (He), heterozigidade observada (Ho), relação entre heterozigidades esperada e máxima ($He/máx$) e coeficiente de endogamia (f) para os oito locos analisados em seis populações de *D. alata* localizadas em Paracatu, MG.

Loco	n	A	Ap	Hmáx	He	Ho	He/Hmáx	Ho/He	f
Do 05	234	2	0	0,500	0,454	0,692	0,907	1,526	-0,528
Do 06	244	4	0	0,750	0,518	0,742	0,691	1,432	-0,433
Do 08a	247	2	0	0,500	0,424	0,607	0,848	1,433	-0,434
Do 08b	244	5	2	0,800	0,165	0,176	0,206	1,069	-0,070
Do 20	237	6	1	0,833	0,494	0,662	0,593	1,340	-0,341
Do 24	233	4	0	0,750	0,615	0,700	0,820	1,138	-0,138
Do 25	204	5	3	0,800	0,524	0,378	0,654	0,721	0,279
Do 35	231	6	0	0,833	0,520	0,753	0,624	1,448	-0,450
Total		34	6						
Média	234,25	4,25	0,75	0,765	0,464	0,589	0,607	1,269	-0,269

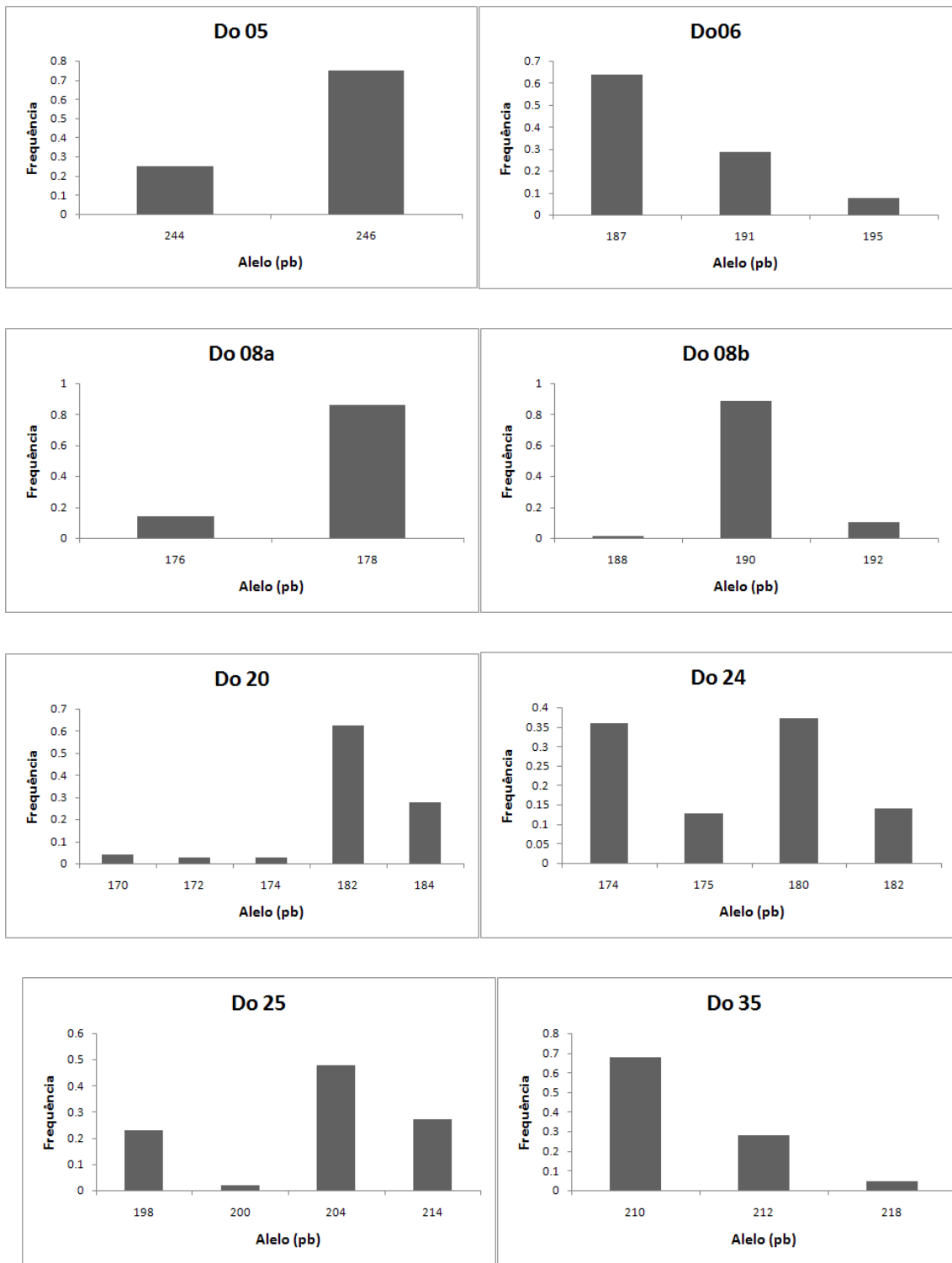


Figura 4.1. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de *D. alata* em área de plantio de recuperação – P1, amostrada em Paracatu, MG.

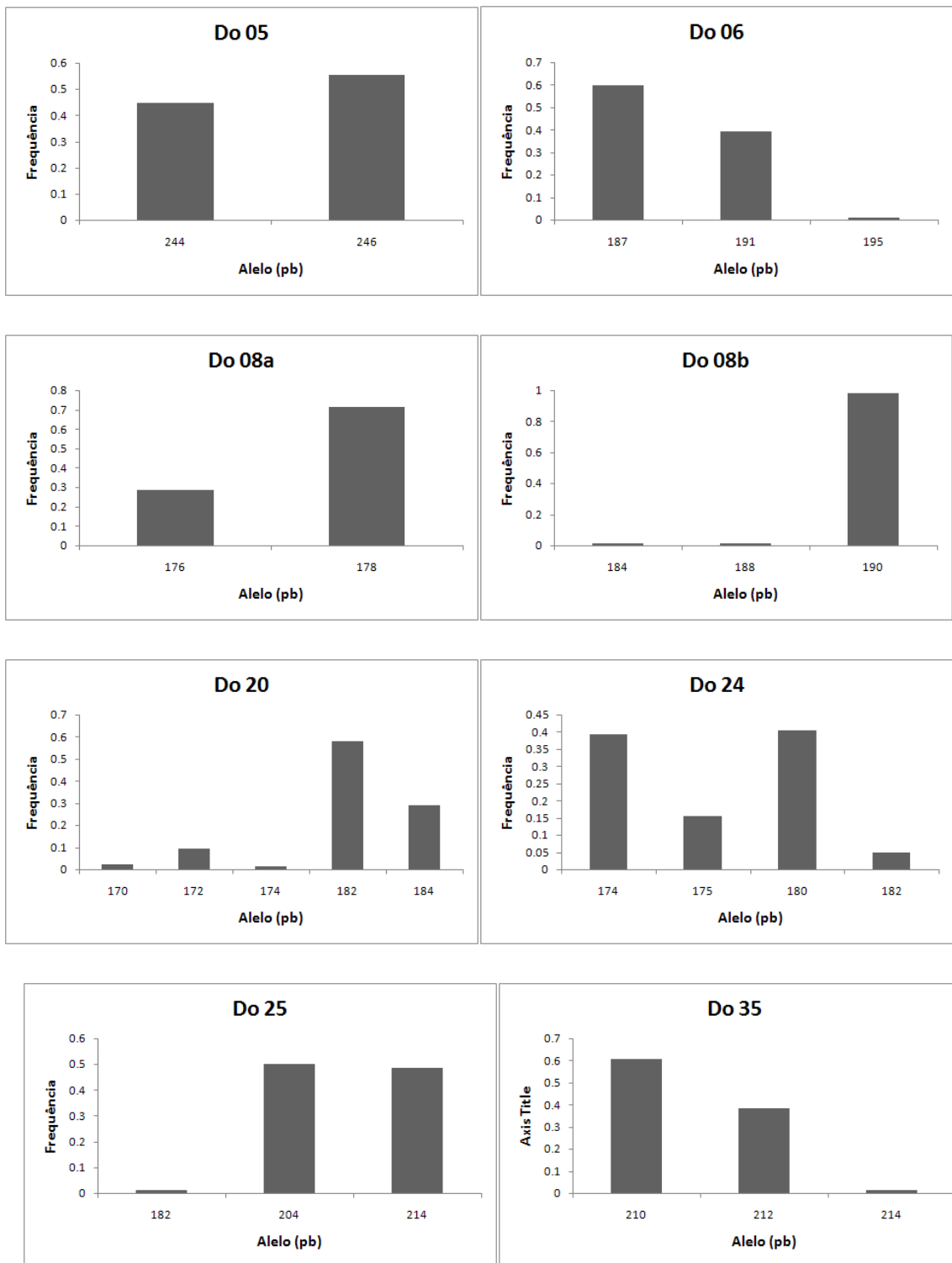


Figura 4.2. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de *D. alata* em área de plantio de recuperação – P2, amostrada em Paracatu, MG.

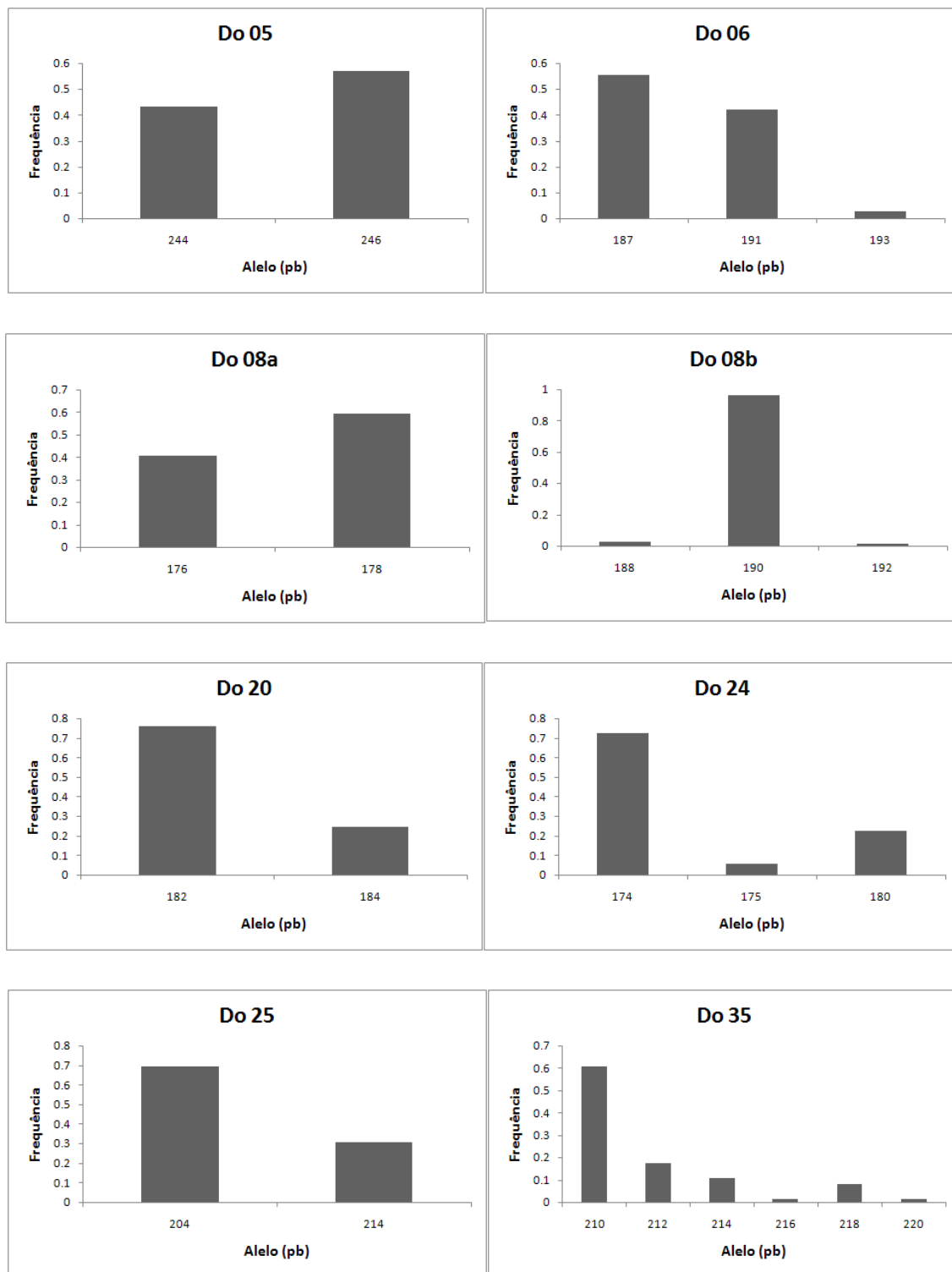


Figura 4.3. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de *D. alata* em área de plantio de recuperação – P5, amostrada em Paracatu, MG.

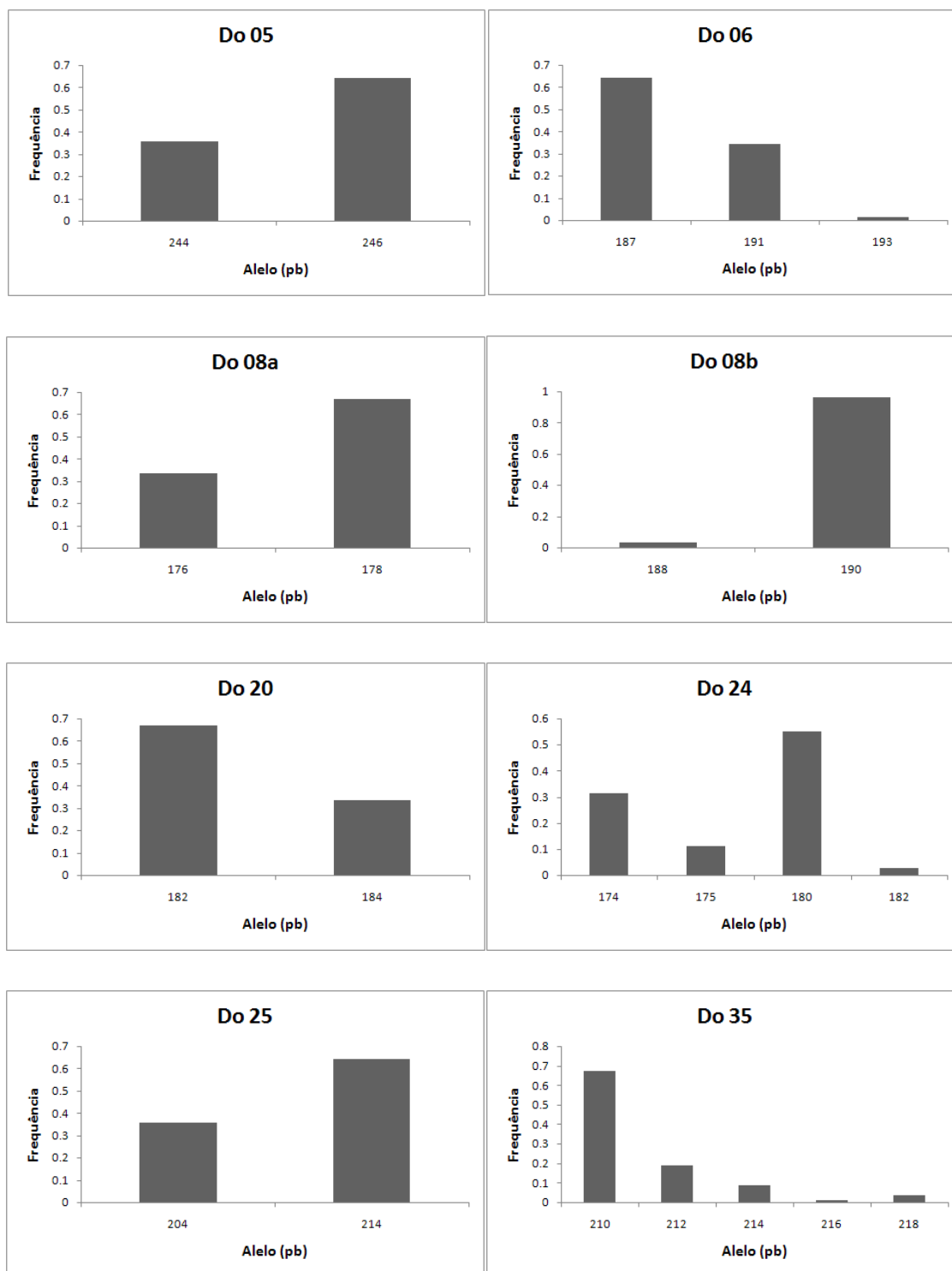


Figura 4.4. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de *D. alata* em área de plantio de recuperação – P6, amostrada em Paracatu, MG.

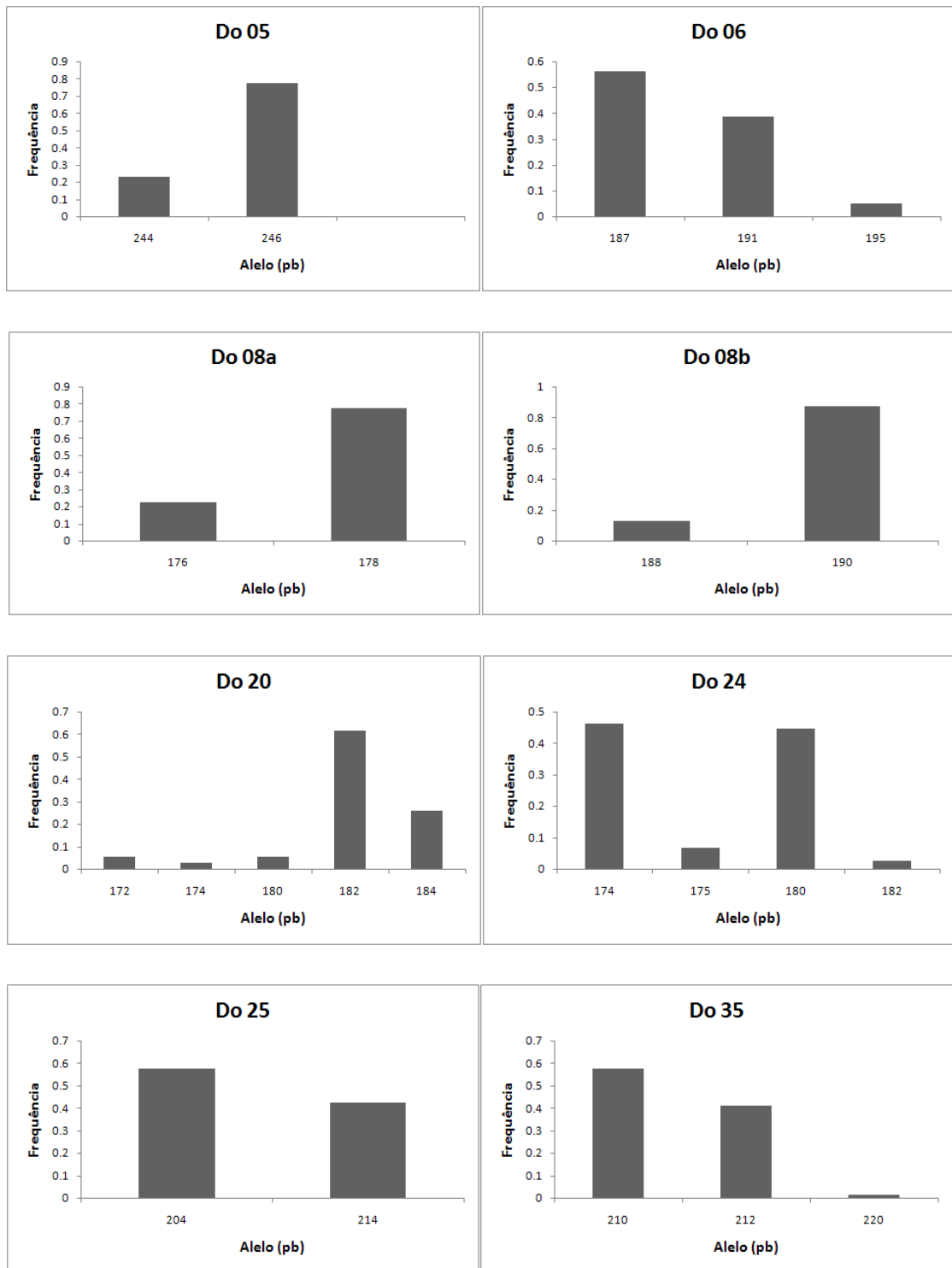


Figura 4.5. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de *D. alata* em área nativa de Cerrado sentido restrito – N1, amostrada em Paracatu, MG.

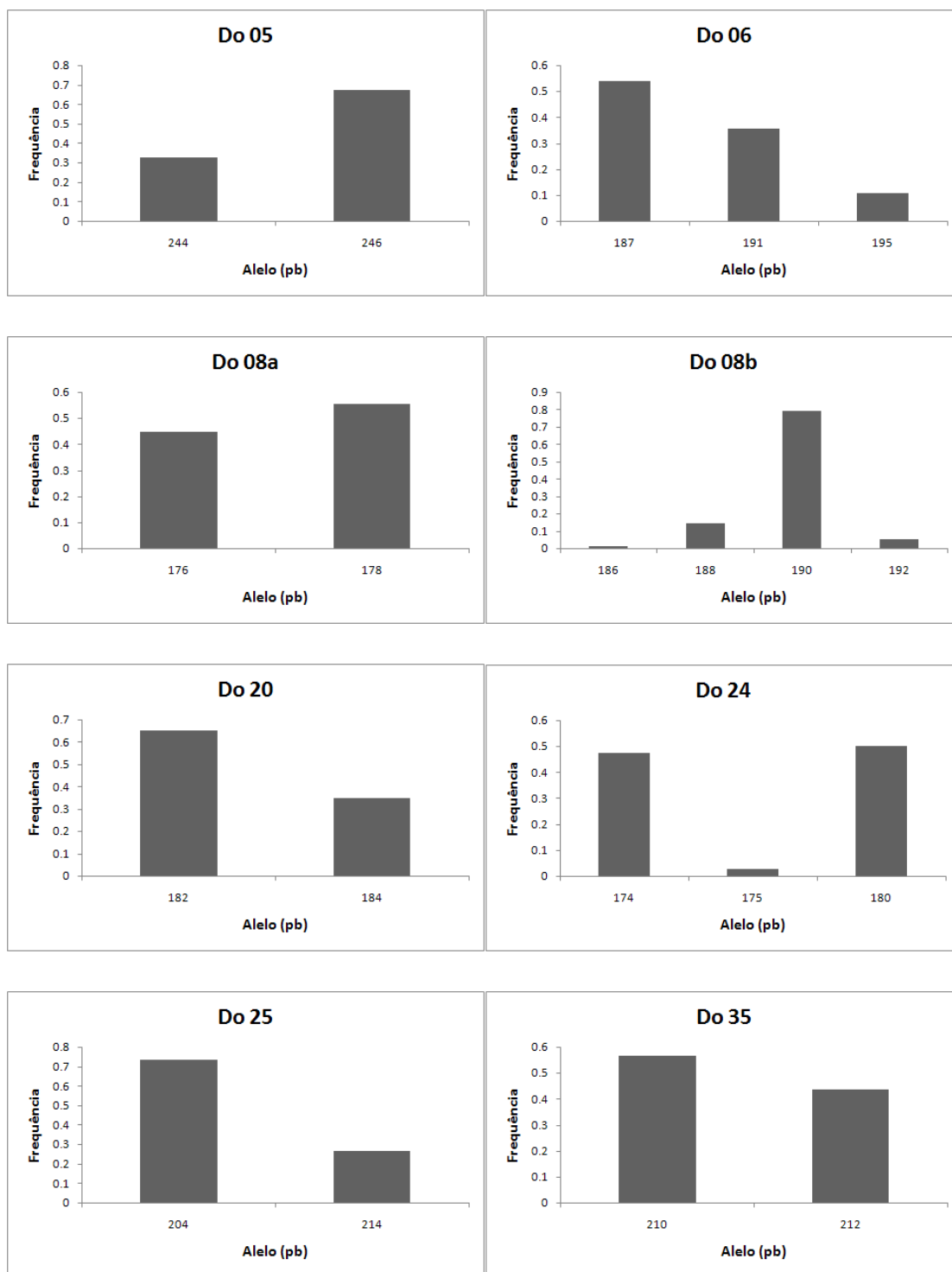


Figura 4.6. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população de *D. alata* em área nativa de Cerrado sentido restrito – N2, amostrada em Paracatu, MG.

As diferenças entre populações de *D. alata* quanto à heterozigiosidade média esperada foram relativamente pequenas. Este parâmetro foi ligeiramente superior e bastante próximo para as populações P1, P2, N1 e N2, com, respectivamente, 0,463, 0,462,

0,452 e 0,472; e um pouco menor para P5 e P6, com, respectivamente, 0,427 e 0,434 (Tabela 4.2). Um bom critério para avaliação dos valores de heterozigosidade esperada é a heterozigosidade máxima, a qual indica a máxima heterozigosidade possível com relação ao número de alelos (RIBAS & KAGEYAMA, 2004). Os valores de heterozigosidade máxima encontrados variaram pouco entre as populações, sendo menor em N2 (0,6) e maior em P1 (0,692) (Tabela 4.2). A relação entre a heterozigosidade esperada e a heterozigosidade máxima foi consideravelmente superior para a população N2 e relativamente semelhante entre as demais populações (Tabela 4.2).

Os valores de heterozigosidade média observada foram maiores nas populações N2 (0,697) e P2 (0,628) e menores nas populações P1, P6, P5 e N1, os quais foram, respectivamente, 0,533; 0,546; 0,564 e 0,570 (Tabela 4.2). Todas populações apresentaram heterozigosidade observada superior à heterozigosidade esperada, o que resultou em coeficientes de endogamia negativos em todas as populações (Tabela 4.2). Os intervalos de confiança para os coeficientes de endogamia indicam que as estimativas são consistentes, sendo inteiramente negativos para todas as populações, exceto por P1, que apresentou intervalo de confiança de -0,348 a 0,037 (Tabela 4.2).

Não foram observadas estimativas de frequências de alelos nulos significativas ($>0,20$) em nenhuma população de *D. alata*. Isso se deve ao fato de que as estimativas de frequências de alelos nulos se baseiam no déficit de heterozigotos com relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (VAN OOSTERHOUT et al., 2004), déficit que não foi observado em nenhuma população analisada.

Os resultados obtidos pela análise comparativa entre a heterozigosidade esperada e a heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação e deriva indicam que ocorreram gargalos genéticos recentes em ambas populações nativas de *D. alata*. A maioria dos locos em ambas as populações apresentaram excesso de heterozigotos com relação ao esperado sob equilíbrio de mutação e deriva sob os três modelos utilizados (IAM, TPM e SMM) (Tabela 4.4). Além disso, o excesso de heterozigotos foi significativo (teste de Wilcoxon; $p < 0,05$) nas duas populações sob os modelos IAM e TPM, porém não foi significativo em nenhuma população sob o modelo SMM (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Número de locos com heterozigidade esperada maior do que a heterozigidade sob equilíbrio de mutação e deriva, de oito locos analisados (*Locos He>Heq*) e P-valores para o teste de Wilcoxon, significativo quando $p < 0,05$ (*P-valores Wilcoxon*) para as duas populações nativas de *D. alata*, N1 e N2, para três modelos de mutação, IAM, TPM e SMM.

População	Modelo					
	IAM		TPM		SMM	
	Locos He > Heq	P-valores Wilcoxon	Locos He > Heq	P-valores Wilcoxon	Locos He > Heq	P-valores Wilcoxon
N1	8	0,00195*	7	0,00586*	6	0,12500
N2	7	0,00391*	7	0,01367*	7	0,09766

De acordo com CORNUET & LUIKART (1996), existem situações em que o excesso de heterozigotos não é observado ao utilizar o modelo SMM, porém ao utilizar um modelo misto, com pequeno desvio em direção ao IAM, é observado este excesso como consequência de ocorrência de gargalo genético. Apesar de não haver um modelo definitivo que explique o processo de mutação de microssatélites, e IAM e SMM serem modelos que descrevem situações extremas, TPM é um modelo intermediário entre IAM e SMM, sendo o mais adequado para microssatélites (DI RIENZO et al., 1994; PIRY et al., 1999). Assim, é possível concluir que ocorreram recentes reduções dos tamanhos efetivos de ambas as populações nativas de *D. alata*.

Os tamanhos efetivos médios variaram de 43,27 a 72,00 entre as populações de *D. alata* avaliadas (Tabela 4.5). A avaliação das populações quanto a este parâmetro pode ser melhor visualizada através da relação entre o tamanho efetivo populacional e o tamanho amostral de cada população. Esta relação foi maior do que a unidade em todas as populações, indicando que os tamanhos efetivos ultrapassaram os tamanhos amostrais das mesmas. Esta relação foi superior na população N2 (1,95), intermediária em P2 (1,57) e P5 (1,48) e inferior em P1 (1,18), P6 (1,35) e N1 (1,35) (Tabela 4.5). Assim, as populações em plantios de recuperação apresentaram tamanhos efetivos, tanto absolutos quanto relativos, quando não maiores, equiparáveis aos tamanhos efetivos das populações nativas.

A população mínima viável estimada para conservação *in situ* em curto prazo, baseada num tamanho efetivo de referência de 50 indivíduos (FRANKEL & SOULÉ, 1981), foi superior para a população P1 (42,32), intermediária para P5 (33,66), P6 (36,91) e N1 (36,89) e inferior para N2 (25,61) e P2 (31,84). Considerando que os tamanhos demográficos das populações P1, P2 e P5 são, respectivamente, 115, 99 e 172, estas apresentam tamanhos muito maiores do que o mínimo viável para conservação *in situ* em

curto prazo, entretanto insuficientemente grandes para conservação em longo prazo. Os dados quanto aos indivíduos sobreviventes na área P6 não foram coletados devido a este plantio ser recente.

Tabela 4.5. Tamanho amostral (n), tamanho efetivo populacional (Ne), relação entre tamanho amostral e tamanho efetivo populacional (Ne/n), população mínima viável com tamanho efetivo de referência de 50 ($PMV(N_{eref}=50)$) e de 500 ($PMV(N_{eref}=500)$) das populações de *D. alata* nas áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e nas áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, para os oito locos avaliados.

Área	Loco	n	Ne	Ne/n	PMV (N _{eref} = 50)	PMV (N _{eref} = 500)
P1	Do 05	40	59,00	1,48	33,90	338,98
	Do 06	40	63,94	1,60	31,28	312,78
	Do 08a	40	46,90	1,17	42,65	426,47
	Do 08b	40	44,46	1,11	44,98	449,84
	Do 20	36	60,63	1,68	29,69	296,88
	Do 24	39	36,94	0,95	52,80	527,95
	Do 25	24	19,30	0,80	62,19	621,92
	Do 35	34	55,45	1,63	30,66	306,59
	Média	36,63	43,28	1,18	42,32	423,17
P2	Do 05	47	239,70	5,10	9,80	98,04
	Do 06	47	117,39	2,50	20,02	200,19
	Do 08a	47	77,55	1,65	30,30	303,03
	Do 08b	47	47,26	1,01	49,73	497,27
	Do 20	43	54,90	1,28	39,16	391,60
	Do 24	42	66,63	1,59	31,52	315,17
	Do 25	39	28,66	0,73	68,05	680,47
	Do 35	43	112,07	2,61	19,19	191,85
	Média	44,38	69,69	1,57	31,84	318,37
P5	Do 05	37	151,70	4,10	12,20	121,95
	Do 06	37	110,36	2,98	16,76	167,63
	Do 08a	38	119,43	3,14	15,91	159,09
	Do 08b	38	38,71	1,02	49,08	490,83
	Do 20	37	53,55	1,45	34,55	345,45
	Do 24	36	34,76	0,97	51,79	517,91
	Do 25	36	26,51	0,74	67,89	678,90
	Do 35	37	46,07	1,25	40,15	401,53
	Média	37,00	54,96	1,49	33,66	336,59

Tabela 4.5. (continuação).

Área	Loco	n	Ne	Ne/n	PMV (Neref = 50)	PMV (Neref = 500)
P6	Do 05	42	92,75	2,21	22,64	226,42
	Do 06	42	87,40	2,08	24,03	240,27
	Do 08a	42	82,50	1,96	25,45	254,55
	Do 08b	42	43,08	1,03	48,75	487,50
	Do 20	42	82,50	1,96	25,45	254,55
	Do 24	40	37,21	0,93	53,75	537,47
	Do 25	42	32,68	0,78	64,26	642,59
	Do 35	40	56,21	1,41	35,58	355,78
	Média	41,50	56,21	1,35	36,92	369,15
N1	Do 05	33	45,83	1,39	36,00	360,00
	Do 06	40	50,77	1,27	39,39	393,90
	Do 08a	42	58,43	1,39	35,94	359,38
	Do 08b	39	45,05	1,16	43,28	432,84
	Do 20	39	55,27	1,42	35,28	352,80
	Do 24	38	62,15	1,64	30,57	305,69
	Do 25	33	25,99	0,79	63,50	634,98
	Do 35	39	125,82	3,23	15,50	154,99
	Média	37,88	51,33	1,36	36,89	368,93
N2	Do 05	35	67,08	1,92	26,09	260,87
	Do 06	38	52,53	1,38	36,17	361,68
	Do 08a	38	194,75	5,13	9,76	97,56
	Do 08b	38	46,37	1,22	40,98	409,77
	Do 20	40	68,75	1,72	29,09	290,91
	Do 24	38	83,48	2,20	22,76	227,61
	Do 25	30	46,07	1,54	32,56	325,58
	Do 35	38	159,60	4,20	11,90	119,05
	Média	36,88	72,00	1,95	25,61	256,08

4.3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação

Quanto à aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, avaliada pelo teste exato de Fisher com base em 10.000 reamostragens pelo método de *bootstrap*, a 5% de probabilidade, foram observados cinco locos com probabilidades significativas na população N1, quatro locos em P1, P5 e P6, três locos em N2 e dois locos em P2. As populações avaliadas em plantios de recuperação, entretanto, são constituídas por indivíduos de diferentes origens, ou seja, são misturas de populações que diferem quanto

às frequências alélicas, situação que dificulta a análise quanto à aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em testes como o de Fisher (HARTL & CLARK, 1997).

A maioria das combinações de locos analisados se encontrou em equilíbrio de ligação. A população que apresentou maior número de combinações de locos em desequilíbrio de ligação foi a N1, com sete combinações, seguida por P1 e P6, com quatro combinações cada, P2 e P5, com duas cada e N2, com nenhuma combinação. Como a interferência de desequilíbrios dentro de locos na significância do desequilíbrio de combinação de locos foi prevenida pela preservação dos genótipos no teste de Fisher (LEWIS & ZAYKIN, 2002), não foi observada relação entre os locos que não aderiram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e combinações de locos em desequilíbrio de ligação. A ocorrência de combinação de locos em desequilíbrio de ligação não foram as mesmas nas populações, o que indica que o desequilíbrio de ligação está associado às populações e não aos locos. Dessa maneira, assim como concluído por MORAES et al. (2007) em situação semelhante, não foi necessário a exclusão de locos das análises.

4.3.3. Estrutura genética espacial

Os resultados obtidos quanto à divergência genética entre populações de *D. alata* são apresentados na Tabela 4.6. A divergência genética para o conjunto de todas as populações foi de 0,0379, com intervalo de confiança de 0,0206 a 0,0559.

O número de migrantes por geração obtido foi de 12,98 entre N1 e N2. Este parâmetro foi calculado apenas para as populações nativas, visto que diferenças quanto à frequências alélicas nos plantios não se devem à deriva genética ou fluxo gênico. Tal estimativa, entretanto, se mostrou inconsistente, apresentando intervalo de confiança de 5,18 a 416,42. De acordo com ALLENDORF & LUIKART (2007), apenas valores moderados a grandes de θp (maiores do que 0,05) resultam em estimativas consistentes de número de migrantes por geração. Para estes autores isto ocorre porque a variância do número de migrantes é muito alta para valores baixos de θp , resultando em intervalos de confiança muito grandes, podendo variar de menos de dez até 1.000. Assim, o grande intervalo de confiança observado para o número de migrantes entre as populações nativas se deve à baixa divergência genética entre estas.

Tabela 4.6. Valores de divergência genética (θp) entre pares de populações de *D. alata* em áreas de plantios de recuperação (P1, P2, P5 e P6) e em áreas nativas (N1 e N2), amostradas em Paracatu, MG, e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, com base em 10.000 reamostragens *bootstrap* (entre parênteses).

	P1	P2	P5	P6	N1
P2	0,03 (0,01 a 0,05)				
P5	0,07 (0,03 a 0,10)	0,04 (0,01 a 0,07)			
P6	0,04 (0,01 a 0,09)	0,01 (0,00 a 0,03)	0,07 (0,00 a 0,14)		
N1	0,02 (0,00 a 0,03)	0,01 (-0,00 a 0,04)	0,05 (0,02 a 0,07)	0,03 (0,01 a 0,05)	
N2	0,05 (0,02 a 0,10)	0,03 (0,01 a 0,06)	0,04 (0,01 a 0,07)	0,06 (0,01 a 0,12)	0,02 (0,00 a 0,05)

Apenas as populações nativas de *D. alata* foram analisadas quanto à distribuição espacial dos genótipos, visto que a distribuição espacial dos indivíduos nos plantios de recuperação não possui relação com fluxo gênico. Além disso, as áreas de plantio são pequenas e *D. alata* apresenta polinização principalmente por abelhas como *Apis mellifera* (THUM & COSTA, 1998/1999; OLIVEIRA & SIGRIST, 2008), a qual apresenta forrageamento em longa distância (BEEKMAN & RATNIEKS, 2000). Assim, a ocorrência de dificuldade de cruzamento entre indivíduos não aparentados devido à presença de estrutura genética espacial dentro das populações em plantios é pouco provável.

O número de pares de indivíduos por classe de distância após análise de distribuição espacial dos genótipos foi de 112 a 113 pares na população N1 e 97 a 98 pares na população N2. Os coeficientes de coancestria baseados em LOISELLE et al. (1995) foram significativamente diferentes de zero na primeira (0,025) e última (-0,02) classe de distância na população N2, indicando que, apesar de muito fraca, existe estrutura genética espacial nesta até a distância de 132 metros (Figura 4.7). Esse resultado indica fraco padrão de isolamento por distância, em que o grau de parentesco entre indivíduos diminui com o aumento da distância entre eles (WRIGHT, 1943). Os coeficientes de coancestria, porém, não foram significativamente diferentes de zero na população N1, apontando para a ausência de estrutura genética espacial nesta população e, portanto, distribuição espacial dos genótipos aleatória (Figura 4.8).

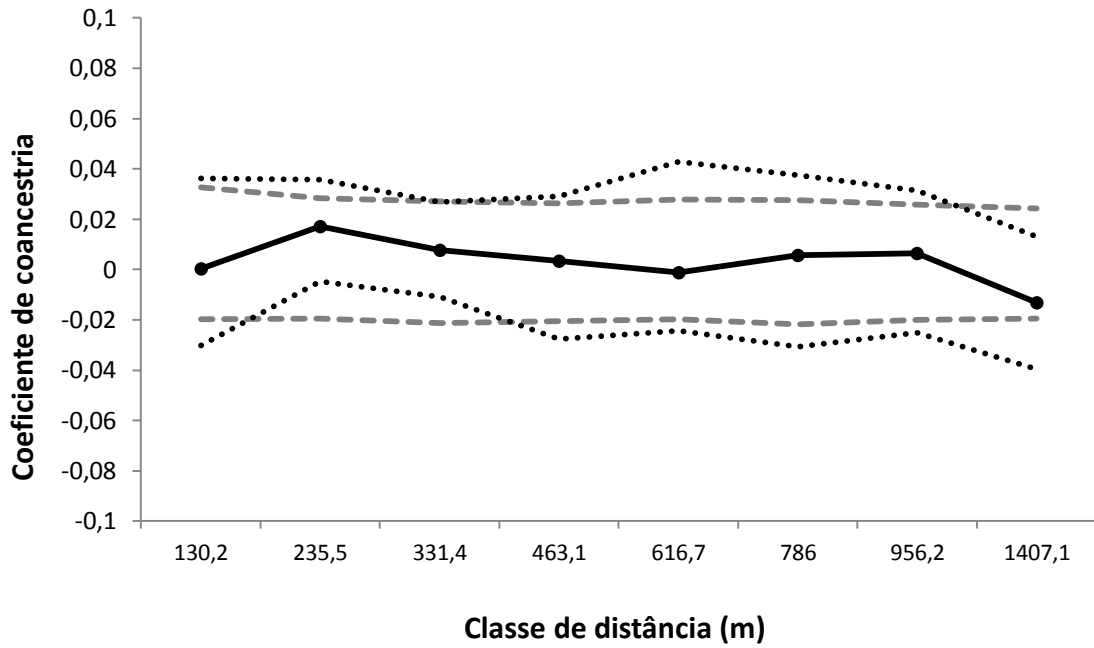


Figura 4.7. Correlograma para coeficiente de coancestria (●) estimado por classes de distâncias, seu intervalo de confiança a 95% (.....) e intervalo de confiança a 95% para teste de ausência de estrutura genética espacial (---) para a população nativa de *D. alata* N1, amostrada em Paracatu, MG.

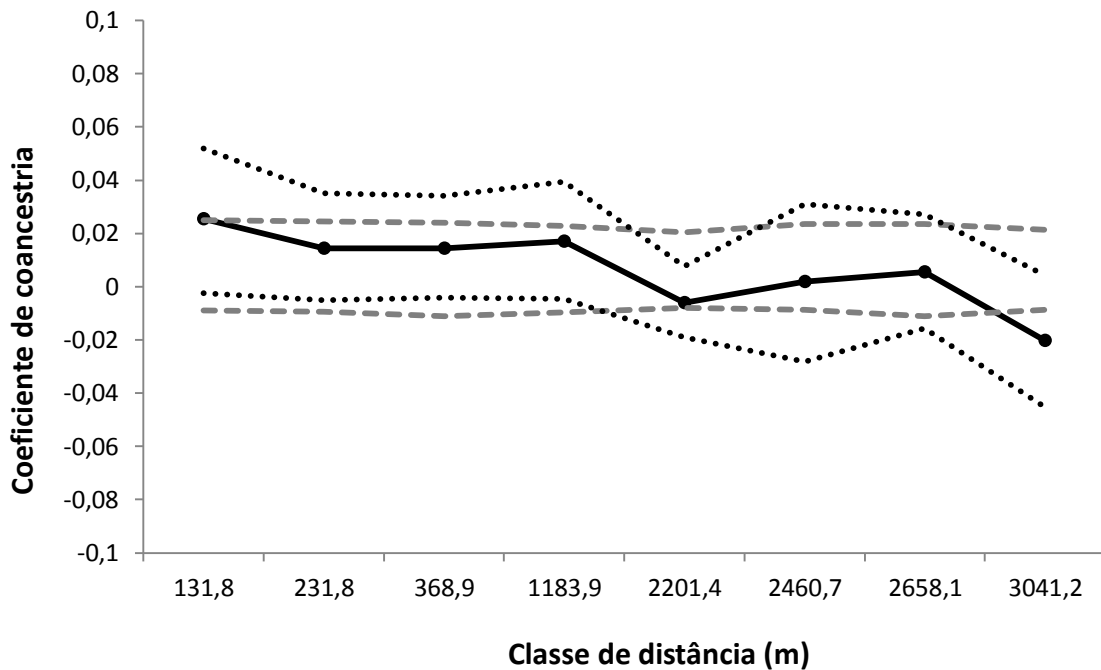


Figura 4.8. Correlograma para coeficiente de coancestria (●) estimado por classes de distâncias, seu intervalo de confiança a 95% (.....) e intervalo de confiança a 95% para teste de ausência de estrutura genética espacial (---) para a população nativa de *D. alata* N2, amostrada em Paracatu, MG.

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Variabilidade genética

Os coeficientes de endogamia negativos e consistentes em todas as populações, a não ser por P1, em que foi inconsistente, indicam que as populações de *D. alata* não são endogâmicas e apresentam excesso de heterozigotos com relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (GILLESPIE, 1998). Isto pode estar relacionados à comum ocorrência de seleção contra homozigotos ao longo do tempo e depressão endogâmica em espécies arbóreas tropicais (SAMPSON et al., 1989; KENNINGTON & JAMES, 1997; MILLAR et al., 2000; SEBBENN et al., 2000; GRIBEL & GIBBS, 2002; HUFFORD & HAMRICK, 2003; KAGEYAMA et al., 2003; RIBAS & KAGEYAMA, 2004b; NAITO et al., 2005; MORAES & SEBBENN, 2011).

Apesar dos números de alelos por loco terem sido consideravelmente baixos em todas as populações analisadas, outros trabalhos que avaliaram a variabilidade genética de populações de *D. alata* através de marcadores SSR observaram valores similares quanto a este parâmetro (Tabela 4.7), o que sugere que este seja o padrão atual para populações da espécie. Assim, ambas populações nativas de *D. alata* podem ser utilizadas para realização de coleta de sementes visando recuperação de áreas degradadas. Entretanto, outras populações locais da espécie devem ser incluídas na amostragem, visto que a variabilidade genética entre indivíduos observada nas populações nativas analisadas não é ideal para a realização de coleta de sementes visando conservação *ex situ*. Isto irá proporcionar aumento da variabilidade genética capturada durante as atividades de coleta (FALK et al., 2001).

Embora as diferenças entre as populações quanto ao número de alelos sejam pequenas, é necessário considerar que foi observado baixo número de alelos em todas estas, e que tais diferenças podem representar muito para a futura adaptação de populações com atuais níveis baixos de variabilidade genética entre indivíduos. DINIZ-FILHO et al. (2012), estimando possíveis impactos de futuras mudanças climáticas na diversidade genética de 25 populações amplamente distribuídas de *D. alata*, encontraram que estas não seriam tão afetadas quanto populações de outras espécies. Porém, de acordo com os autores, a atual baixa variabilidade genética das populações teria mascarado os resultados e, na verdade, faz com que estas populações sejam mais sensíveis ainda a mudanças

climáticas, tendo, nessa situação, qualquer diferença quanto à variabilidade genética grande importância em termos de capacidade de adaptação.

Tabela 4.7. Local de estudo, tamanho amostral (n), número de alelos médio por loco (A), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (f) observados no presente trabalho e em outros trabalhos realizados sobre variabilidade genética de populações de *D. alata* através de marcadores microssatélites.

Trabalho	Local	n	A	He	Ho	f
Presente trabalho	MG					
P1		37	3,25	0,463	0,533	-0,154
P2		44	3,12	0,463	0,628	-0,363
P5		37	3,00	0,427	0,563	-0,327
P6		41	2,75	0,434	0,546	-0,262
N1		38	2,87	0,453	0,569	-0,262
N2		37	2,50	0,472	0,697	-0,488
Tarazi et al. (2010)						
	MS	41	2,9	0,420	0,353	0,161
	MG	30	3,1	0,365	0,323	0,117
	GO	30	3,2	0,375	0,347	0,077
Melo et al. (2011)	Todo o Cerrado	816	2,7	0,36	0,30	0,167

Assim, apesar da diferença ser pequena, existe maior variabilidade genética entre indivíduos nas populações nos plantios de recuperação, excluindo P6, do que nas populações em áreas naturais. Semelhante à situação observada nas populações de *H. stigonocarpa* (Capítulo 3), estes resultados podem ser explicados pelo fato de que as coletas das sementes a serem implantadas nos plantios de recuperação foram realizadas em diferentes áreas naturais. Isto deve ter propiciado a amostragem de maior número de alelos, visto que, de acordo com FALK et al. (2001), a variação genética capturada aumenta a medida que diferentes populações são adicionadas à amostragem. Assim, estes resultados indicam que as coletas de sementes foram eficientes em captar a variabilidade genética da espécie localmente.

Embora a análise de ocorrência de reduções nos tamanhos efetivos tenha sido realizada apenas para as populações nativas de *D. alata*, as populações em plantios de recuperação também apresentaram características associadas à ocorrência de gargalos genéticos recentes. Gargalos genéticos de curta duração têm efeito muito pequeno na heterozigosidade observada, porém reduzem severamente o número de alelos presentes,

sendo os alelos raros perdidos de maneira especialmente rápida (MARUYAMA & FUERST, 1985; ALLENDORF, 1986; FREELAND, 2005). Esta perda de alelos geralmente está associada à diminuição na heterozigosidade esperada, enquanto a heterozigosidade observada pode não diminuir; de fato, pode ocorrer aumento temporário desta em comparação à esperada (FREELAND, 2005). Assim, os indivíduos de *D. alata* nos plantios de recuperação analisados provavelmente são originados de populações com características associadas à ocorrência de gargalos genéticos recentes.

A ocorrência de gargalos genéticos nas populações nativas é corroborada por DINIZ-FILHO et al. (2012), que avaliaram a variabilidade genética de 25 populações de *D. alata*. Estes autores sugerem, com base em análises de coalescência, heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação e deriva e dados de estudos paleoclimáticos, que ocorreram fortes gargalos genéticos para a espécie no passado recente. Além disso, visto que gargalos genéticos podem ser causados por ações que degradam ambientes naturais como exploração indiscriminada e fragmentação (FRANKHAM et al., 2005), a ocorrência de gargalos genéticos recentes nas populações nativas analisadas é justificada pelo histórico da área de estudo, Paracatu. Esta região sofre pressões antrópicas há séculos devido à mineração e agricultura (FELFILI et al., 1992; NERI et al., 2011), sendo apenas 33,52% do seu território composto por flora nativa (SCOLFORO & CARVALHO, 2006).

Com relação às estimativas de tamanhos efetivos, apesar destas serem relativamente altas para todas as populações de *D. alata*, este parâmetro possui limitações, não sendo bom indicador da perda de diversidade alélica dentro de populações (ALLENDORF & LUIKART, 2007; CHARLESWORTH, 2009). Segundo estes autores, populações que passam por taxas de declínio da heterozigosidade iguais podem passar por taxas de perda de diversidade alélica muito diferentes. Assim, como foi detectada ocorrência de gargalos genéticos recentes nas populações nativas de *D. alata*, assumiu-se que o tamanho efetivo não é o parâmetro mais adequado para a avaliação da variabilidade genética e para a definição de estratégias de conservação *in situ* destas populações.

Embora as populações de *D. alata* tenham apresentado alta variabilidade genética dentro de indivíduos em comparação com a panmixia, apresentaram baixa variabilidade genética entre indivíduos. Segundo ALLENDORF (1986), a heterozigosidade fornece boa medida da capacidade da população em responder a seleção imediatamente após passar por gargalo genético, porém o número de alelos remanescentes são importantes para a resposta

em longo prazo à seleção e sobrevivência de populações e espécie. O número de alelos, de acordo com PETIT et al. (1998), deveria ter prioridade máxima como parâmetro para análise do estado de conservação de populações, por ser um bom indicador de mudanças demográficas passadas. Assim, apesar das populações em plantios de recuperação terem apresentado padrões de variabilidade genética similares ao encontrado em populações nativas, a baixa variabilidade genética entre indivíduos observada tanto nas populações nativas quanto nas populações em plantios pode acarretar em problemas sérios de adaptação em longo prazo.

Visto que foi observado baixo número de alelos e que alguns destes apresentaram frequência muito alta, possuindo grande chance de serem fixados (HARTL & CLARK, 1997), recomenda-se a manutenção de áreas com vegetação nativa próximas às populações analisadas de *D. alata* em plantios de recuperação e em áreas naturais, de maneira a formar corredores ecológicos. Isto propiciará fluxo gênico entre populações da espécie, evitando que alelos sejam perdidos e/ou fixados (SLATKIN, 1987). A necessidade de tal medida de manejo é acentuada pela ocorrência de gargalos genéticos em ambas populações nativas. A variabilidade genética perdida com ocorrência de gargalos genéticos dificilmente é recuperada se esta for mantida baixa por longo período, sendo necessário atuação de fluxo gênico ou mutações ao longo de várias gerações (BISHOP et al., 2009; FRANKHAM et al., 2005). Assim, o manejo de populações que passaram por gargalos genéticos não deve ser adiado, podendo a população sofrer intensa depressão endogâmica caso sua variabilidade genética permaneça baixa por algumas décadas (O'GRADY et al., 2008).

4.4.2. Estrutura genética espacial

Quanto à divergência genética entre pares de populações (θ_p), de acordo com as classificações de FREELAND (2005) e HARTL & CLARK (1997) todos os pares de populações analisados de *D. alata* apresentaram divergência genética pequena, a não ser por P1 e P5, P5 e P6, e P6 e N2, os quais apresentaram divergência genética moderada. Os pares P1 e P5, P5 e P6, e P6 e N2, porém, além de apresentarem valores de θ_p próximos ao considerado indicativo de divergência baixa, apresentaram intervalos de confiança incluindo valores que indicam divergência desde baixa a moderada (HARTL & CLARK, 1997; FREELAND, 2005). A divergência genética para o conjunto de todas as populações, por sua vez, pode ser considerada baixa (HARTL & CLARK, 1997; FREELAND, 2005).

Assim, estes resultados indicam que existe baixa variabilidade genética entre as populações de *D. alata* analisadas (HOLSINGER & WEIR, 2009).

Com relação à distribuição espacial dos genótipos das populações nativas de *D. alata*, a literatura sugere que a presença de estrutura genética espacial varie entre populações desta espécie. SOARES et al. (2008) observaram estrutura genética espacial em duas das três populações avaliadas de *D. alata*, com valores significativos de distância genética de Tanimoto, iguais a 0,34 e 0,21, em até 1.745 e 40 metros de distância, respectivamente. TARAZI et al. (2010), semelhantemente, observaram estrutura genética espacial em duas das três populações avaliadas desta espécie, com valores de coeficiente de coancestria significativos (0,064 e 0,068) até a distância de 196 metros.

A ocorrência de divergências de resultados entre estudos da mesma espécie e entre populações do mesmo estudo pode ser explicada pelo fato de que a estrutura genética espacial em populações é afetada por vários fatores. Entre estes podem ser citados: características da paisagem, heterogeneidade ambiental, densidade populacional, morfologia floral, sistema reprodutivo, mecanismos de polinização e dispersão de sementes, características qualitativas e quantitativas dos agentes polinizadores e dispersores de sementes presentes na área, ocorrência de eventos históricos, interações ecológicas intra e inter-específicas e relações ecológicas geneticamente influenciadas (LOVELESS & HAMRICK, 1984; HEYWOOD, 1991; HAMRICK et al., 1993; MANEL et al., 2003; VEKEMANS & HARDY, 2004). Dessa maneira, diferentes populações apresentam estruturas genéticas espaciais diferentes.

A ausência de estrutura genética espacial observada em N1 e estrutura muito fraca observada em N2 pode ter relação com a natureza dos principais agentes polinizadores desta espécie, abelhas (THUM & COSTA, 1998/1999; OLIVEIRA & SIGRIST, 2008), e principais animais dispersores de frutos e sementes, morcegos (CARVALHO, 2003; FERREIRA, 1980; SANO et al., 2004). *Apis mellifera*, uma das principais abelhas que polinizam *D. alata*, apresenta forrageamento a distâncias tão longas quanto 9,5 quilômetros (BEEKMAN & RATNIEKS, 2000), podendo alterar a estrutura genética de populações remanescentes através de constante fluxo gênico a longas distâncias (DICK, 2001). Isso é corroborado por TARAZI et al. (2010), que encontraram distâncias de polinização de até 1.388 metros através de testes de paternidade em populações de *D. alata*. Os morcegos, por

sua vez, são agentes dispersores de sementes com capacidade de deslocamento de longa distância (SANO et al., 2004).

O fato da população N2 ter apresentado fraca estrutura genética espacial na primeira classe de distância, de até 132 metros, indica que, apesar da efetividade dos agentes com relação à distância de polinização e dispersão de sementes, algum outro fator tenha limitado a distribuição completamente aleatória dos genótipos nesta população. TARAZI et al. (2010) encontraram evidências de dispersão de pólen a longas distâncias e concluíram que o principal fator que causa estruturação nas populações de *D. alata* é a dispersão de sementes restrita, sugerindo que a gravidade tenha papel maior na dispersão de sementes do que a dispersão por animais como morcegos, os quais geralmente dispersam os frutos de *D. alata*. Assim, é possível que a estruturação observada em N2 tenha relação com maior atuação de barocoria do que zoocoria nesta população.

Considerando os resultados aqui obtidos quanto a distribuição espacial dos genótipos e aqueles obtidos por TARAZI et al. (2010), sugere-se que seja respeitado o limite mínimo de 200 metros entre árvores matrizes durante as coletas de sementes nas populações nativas analisadas, visando não amostrar indivíduos aparentados. Cabe ressaltar que este trabalho não teve como objetivo definir outros parâmetros para a coleta de sementes nas populações nativas estudadas além da distância mínima entre árvores-matrizes. Nesse sentido, não deve ser subestimada a importância da amostragem do maior número possível de indivíduos e populações (BROADHURST et al., 2008) e da coleta de número de sementes aproximadamente igual por indivíduo amostrado (VENCOVSKY, 1987; VENCOVSKY et al., 2007).

4.5. CONCLUSÃO

A variabilidade genética entre e dentro de indivíduos nas populações de *D. alata* em plantios de recuperação de áreas degradadas foi semelhante àquela observada nas populações em áreas nativas de Cerrado sentido restrito, o que indica que a coleta de sementes foi eficiente em captar a variabilidade genética local da espécie. Entretanto, a baixa variabilidade genética entre indivíduos observada em todas as populações analisadas, relacionada com a ocorrência de gargalos genéticos recentes em ambas populações nativas, sugere que poderão ocorrer problemas associados à resposta à seleção em longo prazo

tanto nas populações nas áreas de plantios de recuperação como nas áreas nativas. Devido ao baixo número de alelos, à alta frequência de alguns destes e à ocorrência de gargalos genéticos, recomenda-se a manutenção de áreas com vegetação nativa próximas às populações avaliadas em plantios de recuperação e em áreas naturais, de maneira a propiciar fluxo gênico e evitar a fixação de alelos nestas. Visto que níveis baixos de variabilidade genética entre indivíduos parecem ser o padrão atual para a espécie, ambas populações nativas analisadas podem ser utilizadas para a realização de coleta de sementes visando a produção de mudas para uso em plantios de recuperação de áreas degradadas. Contudo, é de extrema importância que a coleta de sementes inclua outras populações locais da espécie, de maneira a propiciar amostragem da maior variabilidade genética possível. Sugere-se que durante as atividades de coleta de sementes nestas populações seja respeitada a distância mínima de 200 metros entre árvores matrizes, de maneira evitar a amostragem de indivíduos aparentados.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

As populações de *Hymenaea stigonocarpa* (Jatobá-do-Cerrado) e de *Dipteryx alata* (Baru) apresentaram resultados diferentes quanto à viabilidade genética nos plantios de recuperação de áreas degradadas e quanto ao manejo que deve ser adotado. As populações de *H. stigonocarpa* em plantios de recuperação apresentaram problemas associados à variabilidade genética dentro de indivíduos, sendo necessário realizar manejo das condições ambientais nestas áreas e manter áreas nativas próximas a estas, a fim de que os indivíduos implantados sobrevivam e se reproduzam por cruzamentos, proporcionando a possibilidade de aumento de heterozigosidade. As populações de *D. alata*, por sua vez, tanto em plantios de recuperação como em áreas nativas, apresentaram problemas associados à variabilidade genética entre indivíduos, sendo necessário a manutenção de áreas com vegetação nativa próximas às populações analisadas, de maneira a propiciar fluxo gênico e evitar a fixação de alelos. Essas diferenças entre as populações de *D. alata* e de *H. stigonocarpa* demonstram que as espécies divergem quanto aos aspectos genético-populacionais, o que está relacionado a características ecológicas e padrões evolutivos de cada espécie. Assim, recomendações relativas à recuperação de áreas degradadas, como coleta de sementes e manejo dos plantios, devem ser feitas com base não apenas nas características ecológicas das espécies, mas também com base em suas características populacionais, e não de maneira generalizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F. W. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. **Zoo Biology**, v.5, n.2, 1986. p.181-190.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the Genetics of Populations**. Blackwell Publishing, 2007. 642p.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa - CPAC, 1998. 464p.
- AZEVEDO, V. C. R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. Brasília, DF, 2007. 215p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Molecular.
- BEEKMAN, M.; RATNIEKS, F. L. W. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. **Functional Ecology**, v. 14, 2000. p.490-496.
- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, v.27, n.3, 1997. p.415-424.
- BISHOP, J. M.; LESLIE, A. J.; BOURQUIN, S. L.; O'RYAN, C. Reduced effective population size in an overexploited population of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). **Biological Conservation**, v.142, 2009. p.2335-2341.
- BOTHMER, R. V.; SEBERG, O. Strategies for the collecting of wild species. In: GUARINO, L.; RAO, V. R.; REID, R. (eds.). **Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines**. Wallingford: CAB International, 1995. p.95-111.
- BOUZAT, J. L.; JOHNSON, J. A.; TOEPFER, J. E.; SIMPSON, S. A.; ESKER, T. L.; WESTEMEIER, R. L. Beyond the beneficial effects of translocations as an effective tool for the genetic restoration of isolated populations. **Conservation Genetics**, v.10, 2009. p.191-201.
- BRANCALION, P. H. S.; GANDOLFI, S.; RODRIGUES, R. R. Incorporação do conceito da diversidade genética na restauração ecológica. In: RODRIGUES, R.R.;

- BRANCALION, P.H.S.; ISERNHAGEN, I. (orgs.). **Pacto para a restauração da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. São Paulo, SP: Instituto BioAtlântica, v.1, 2009. p.37-54.
- BRASIL. **Cerrado e Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2007. 397p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normas climatológicas: 1961-1990**. Brasília, DF: Departamento Nacional de Meteorologia, 1992. 84p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Plano Diretor de Recursos Hídricos da Bacia do Rio Paracatu**. Brasília, DF: PLANPAR, 1996.
- BROADHURST, L. M.; LOWE, A.; COATES, D. J.; CUNNINGHAM, S. A.; MCDONALD, M.; VESK, P. A.; YATES, C. Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. **Evolutionary Applications**, v.1, n.4, 2008. p. 587–597.
- BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v.5, 1996. p.453-455.
- BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; GERLACH, J.; HOFFMANN, M.; LAMOREUX, J. F.; MITTERMEIER, C. G.; PILGRIM, J. D.; RODRIGUES, A. S. L. Global biodiversity conservation priorities. **Science**, 2006, v.313, p.58-61.
- BROQUET, T.; PETIT, E. J. Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.40, 2009. p. 193-216.
- BROWN, A. H. D.; MARSHALL, D. R. A basic sampling strategy: theory and practice. In: GUARINO, L.; RAO, V. R.; REID, R. (eds.). **Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines**. Wallingford: CAB International, 1995. p.75-91.
- CALLEN D.F., THOMPSON A.D., SHEN Y., PHILLIPS H.A., RICHARDS H.I., MULLEY J.C., AND SUTHERLAND G.R. Incidence and origin of “null alleles”

- in the “AC” microsatellite markers. **The American Journal of Human Genetics**, v.52, 1993. p.922-927.
- CARVALHO, P. E. R. Cumaru-Ferro (*Dipteryx odorata*). **Comunicado Técnico**, v.225. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2009. 8p.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**, v.1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 1039p.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**, v.2. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 627p.
- CHARLESWORTH, B. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. **Nature Reviews - Genetics**, v.10, 2009. p.195-205.
- CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.8, n.5, 2008. p.1074-1077.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, 1969. p.72-84.
- COHEN, J. I.; WILLIAMS, T.; PLUCKNETT, D. L.; SHANDS, H. Ex Situ Conservation of Plant Genetic Resources: Global Development and Environmental Concerns. **Science**, v. 253, 1991. p.866-871.
- CORNUET, J. M. & LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v.144, 1996. p.2001-2014.
- CRAD. **Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas - Universidade de Brasília**. Retirado de <http://www.crad.unb.br/>. Acesso em: 5 de março de 2013.
- CROW, J.; KIMURA, M. **An Introduction to Population Genetics Theory**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1970. 591p.

- DAMASCENO, A. G. **Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) visitantes das inflorescências da sucupira-branca *Pterodon emarginatus* Vogel (Leguminosae: Papilionoideae) e do baru *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae: Papilionoideae) em área de Cerrado em Brasilândia de Minas, MG.** Lavras, MG, 1998. 65p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras.
- DEFAVARI, G. R.; TARAZI, R.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y. Spatial genetic structure of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne in the Ecological Station of Itirapina, SP. **Scientia Forestalis**, v.37, n.81, 2009. p.89-98.
- DEGEN, B.; CARON, H.; BANDOU, E.; MAGGIA, L. CHEVALLIER, M. H.; LEVEAU, A.; KREMER, A. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. **Heredity**, v.87, n.4, 2001. p.497-507.
- DEWEY, S. E.; HEYWOOD, J. S. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa* I: Distribution of genotypes. **Evolution**, v. 42, 1988. p.834-38.
- DI RIENZO, A.; PETERSON, A. C.; GARZA, J. C.; VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Mutational processes of Simple-Sequence Repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, n.8, 1994. p.3166-3170.
- DICK, C. W. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v.268, 2001. p.2391-2396.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; COLLEVATTI, R. G.; CHAVES, L. J.; SOARES, T. N.; NABOUT, J. C.; RANGEL, T. F.; MELO, D. B.; LIMA, J. S.; TELLES, M. P. C. Geographic shifts in climatically suitable areas and loss of genetic variability in *Dipteryx alata* ("Baru" Tree; Fabaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.2, 2012. p.1618-1626.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, 1987. p.13-15.

- DURIGAN, G. Bases e diretrizes para a restauração da vegetação de Cerrado. In: KAGEYAMA, P.Y.; OLIVEIRA, R.E.; MORAES, L.F.O.; ENGEL, V.E.; GANDARA, F.B. (eds.). **Restauração ecológica de sistemas naturais**. Botucatu: FEPAP, 2003. p.187-204.
- EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Mapa de solos do Brasil, 1:5.000.000**. Rio de Janeiro, 1981.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrado, 2007. 102p.
- FALK, D.A.; KNAPP, E.E.; GUERRANT, E.O. **An Introduction to Restoration Genetics**. Society for Ecological Restoration, 2001. 32p.
- FAO. Collecting woody perennials. Forest Resources Division, Forestry Department, FAO. In: GUARINO, L.; RAO, V. R.; REID, R. (eds.). **Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines**. Wallingford: CAB International, 1995. p. 485-509.
- FELFILI, J. M.; FAGG, C. W.; PINTO, J. R. R. Modelo nativas do bioma *stepping stones* na formação de corredores ecológicos, pela recuperação de áreas degradadas no Cerrado. In: ARRUDA, M. B. (org.). **Gestão Integrada de Ecossistemas Aplicada a Corredores Ecológicos**. Brasília, DF: IBAMA, 2006. p.187-209.
- FELFILI, J. M.; RIBEIRO, J. F.; FAGG, C. W.; MACHADO, J. W. B. **Recuperação de matas de galeria**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 2000. 45p.
- FELFILI, J. M.; SILVA-JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; MACHADO, J. W. B.; WALTER, B. M. T.; SILVA, P. E. N.; HAY, J. V. **Acta Botanica Brasilica**, v.6, n.2, 1992. p.27-46.
- FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis nativos do Cerrado em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v.6, n.61, 1980. p.9-18.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

- FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de Caracterização Molecular de Germoplasma Vegetal. In: NASS, L. L. **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.377-420.
- FINKELDEY, R.; HATTEMER, H. H. **Tropical Forest Genetics**. Berlin: Ed. Springer, 2007. 315p.
- FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. S. **Conservation and Evolution**. London: Cambridge University Press, 1981. 327 p.
- FRANKHAM, R.; BALLOUX, J. D.; BRISCOE, D. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 617p.
- FRANKLIN, I. R.; FRANKHAM, R. How large must populations be to retain evolutionary potential? **Animal Conservation**, v.1, 1998. p.69-70.
- FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd., 2005. 403p.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 631p.
- GANDARA, F. B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. Campinas, SP, 1996. 69p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas.
- GIBBS, P. E.; OLIVEIRA, P. E.; BIANCHI, M. B. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of Brazilian Cerrados. **International Journal of Plant Sciences**, v.160, 1999. p.72-78.
- GILLESPIE, J. H. **Population Genetics: A Concise Guide**. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1998. 169p.
- GILPIN, M. E.; SOULÉ, M. E. Minimum viable populations: the processes of species extinctions. In: SOULÉ, M. E. (ed.). **Conservation Biology: The Science of scarcity and diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 1986. p.19-34.

- GLAUBITZ, J. C. & MORAN, G. F. Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest Conservation Genetics: Principles and Practice**. Collingwood: Ed. CSIRO, 2000. p.39–59.
- GONÇALVES, A. C.; REIS, C. A. F.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.2, 2010. p.325-332.
- GRATTAPAGLIA, D. Aplicações Operacionais de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A. (ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007. p.175-200.
- GRIBEI, R.; GIBBS, P. E. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v.163, 2002. p.1035-1043.
- GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v.11, n.4, 2011. p.591-611.
- GUIDUGLI, M. C. **Estudos genéticos da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze: diversidade, sistema de cruzamento e fluxo gênico contemporâneo**. Ribeirão Preto, SP, 2011. 170p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Genética.
- HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, n.10, 1982. p.1685-1693.
- HAMRICK; J. L.; MURASWSKI, D. A.; NASON, J. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetation**, v.107/108, 1993. p.281-297.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. **SPAGeDi 1.3: a program for Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity**. Users Manual. 2002-2009. 33p. Disponível em:

http://ebe.ulb.ac.be/ebe/Software_files/manual_SPAGeDi_1-3.pdf. Acesso em: 7 de agosto de 2011.

HARIDASAN, M. Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n.1, 2000. p.54-64.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. 3.ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1997. 542p.

HAVENS, K.; VITT, P.; MAUNDER, M.; GUERRANT JR, E. O.; DIXON, K. Ex Situ Plant Conservation and Beyond. **BioScience**, v. 56, 2006. p.525-531.

HAWKES, J. G. Germplasm collection, preservation and use. In: FREY, K. J. **Plant breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1981. p.57-83.

HEITHAUS, E. R.; FLEMING, T. H.; OPLER, P. A. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bat in a Seasonal Tropical Forest. **Ecology**, v.56, 1975. p.841-854.

HERINGER, E.P.; BARROSO, G.M.; RIZZO, J.A.; RIZZINI, C.T. A Flora do Cerrado. In: Ferri, M.G. (coord.) **IV Simpósio sobre o Cerrado: bases para utilização agropecuária**. São Paulo: Ed. USP, 1976. p.211–232.

HEYWOOD. J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.22, 1991. p.335-355.

HOBBS, R.J. Foreword. In: FALK, D.A.; PALMER, M.A.; ZEDLER, J.B. (eds.). **Foundations of Restoration Ecology**. Washington: Island Press, 2006. 379p.

HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating, and interpreting F_{st}. **Nature Reviews - Genetics**, v.10, 2009. p.639-650.

HUFFORD, K. M.; HAMRICK, J. L. Variability selection at three early life stages of the tropical tree *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **Evolution**, v.57, 2003. p.518-526.

- HUFFORD, K. M.; MAZER, S. J. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, 2003. p.147-155.
- JANE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, v.11, 1996. p.424-429.
- KAGEYAMA, P. Y.; CUNHA, G. C.; BARRETO, K. D.; GANDARA, F. B.; CAMARGO, F. R. A.; SEBBENN, A. M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia Forestalis**, n.64, 2003. p.108-119.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Resultados do programa de restauração com espécies arbóreas nativas do convênio ESALQ/USP e CESP. In: GALVÃO, A. P. M. & PORFÍRIO-DA-SILVA, V. (eds.). **Restauração Florestal: Fundamentos e Estudos de Caso**. Colombo, PR: Embrapa, 2005. p.47-58.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Resultados do programa de restauração com espécies arbóreas nativas do convênio ESALQ/USP e CESP. In: GALVÃO, A. P. M. & PORFÍRIO-DA-SILVA, V. (eds.). **Restauração Florestal: Fundamentos e Estudos de Caso**. Colombo, PR: Embrapa, 2005. p.47-58.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Revegetação de Áreas Ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. (eds.). **Matas Ciliares: Conservação e Recuperação**. São Paulo, SP: Ed. USP/FAPESP, 2000. p.249-269.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, v.12, n.32, 1998. p.65-70.
- KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIN, M.B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.64, 2003. p.93-107.
- KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v.177, 2011. p.309-334.

- KALINOWSKI, S. T. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v.5, 2004. p.539-543.
- KENNINGTON, W. J.; JAMES, S. H. The effect of small population size on the mating system of a rare mallee, *Eucalyptus argutifolia* (Myrtaceae). **Heredity**, v.78, 1997. p.252-260.
- KIER, G.; MUTKE, J.; DINERSTEIN, E.; RICKETTS, T. H.; WOLFGANG, K.; KREFT, H.; BARTHLOTT, W. Global patterns of plant diversity and floristic knowledge. **Journal of Biogeography**, 2005, v. 32, p.1107-1116.
- KIMURA, M. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. **Molecular Biology and Evolution**, v.1, 1983. p. 84-93.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v.49, 1964. p.725-738.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v.1, 2005. p.147-155.
- KORBIE, D. J.; MATTICK, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols**, v.3, 2008. p.1452-1456.
- LEBERG, P. L. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. **Molecular Ecology**, v.11, 2002. p.2445-2449.
- LEE, Y.; LANGENHEIM, J. H. **Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae)**. Los Angeles: University of California Press, v.69, 1975. 190p.
- LESICA, P.; ALLENDORF, F. W. Ecological Genetics and the Restoration of Plant Communities: Mix or Match? **Restoration Ecology**, v.7, n.1, 1999. p.42-50.
- LEWINSOHN, T. M. **Predação de sementes em *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae): aspectos ecológicos e evolutivos**. Campinas, SP, 1980. 192p. Dissertação (Mestrado em Biologia), Instituto de Biologia, Universidade de Campinas.

- LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. p.127-161.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **GDA User's Manual**. 2002. 45p.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**, 2001. Disponível em : <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Acesso em: 5 de maio de 2011.
- LEWONTIN, R. C. **Genetic Basis of Evolutionary Change**. Columbia University Press, New York, 1974. 346p.
- LI, D.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in Plant Science**, v.14, 2009. p.614-621.
- LIMA, J. E. F. W.; SILVA, E. M. Recursos Hídricos do Bioma Cerrado: Importância e Situação. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (eds.). **Cerrado: Ecologia e Flora**, v.1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.89-106.
- LOISELLE, B. A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v.82, n. 11, 1995. p.1420-1425.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**, v.1, 4.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos de Flora Ltda, 2002. 368p.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.15, 1984. p.65-95.
- LUIKART, G.; CORNUET, J. M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, v.13, 1998. p.523-530.
- LYNCH, M.; CREASE, T. J. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. **Molecular Biology and Evolution**, v.7, 1990. p.377-394.

- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 1998. 980p.
- MALTEZ, H. M. **Estrutura genética de *Aspidoperma polyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae (Peroba Rosa) em uma floresta estacional semidecídua no Estado de São Paulo**. Campinas, SP, 1997. 132p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas.
- MANEL, S.; SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, v.18, n.4, 2003. p.189–197
- MARSHALL, D. R.; BROWN, A. H. D. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: FRANKEL, O. H.; HAWKES, J. G. (eds.). **Crop genetic resources for today and tomorrow**. Cambridge: Cambridge University Press, 1975. p.53-80.
- MARUYAMA, T.; FUERST, P. A. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics II: Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. **Genetics**, v.111, 1985. p.675-689.
- MCKAY, J. K.; CHRISTIAN, C. E.; HARRISON, S.; RICE, K. “How Local Is Local?” - A Review of Practical and Conceptual Issues in the Genetics of Restoration. **Restoration Ecology**, v.13, n. 3, 2005. p.432-440.
- MEFFE, G. K.; CARROL, C. R. **Principles of Conservation Biology**. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 1994. 600p.
- MELO, D. B.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; OLIVEIRA, G.; SANTANA, L. L.; SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V.; COLLEVATTI, R. G.; TELLES, M. P. C. Optimizing sampling efforts for ex situ conservation of genetic variability of *Dipteryx alata* Vogel. In: IUFRO Tree Biotechnology Conference, 2011, Arraial D´ajuda, BA. **BMC Proceedings**, v.5, suppl.7, 2011. p.18-18.
- MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA-JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; SILVA, P. E. N.; FAGG, C. W. Flora Vascular do Bioma Cerrado: *checklist* com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.;

- ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (eds.). **Cerrado: Ecologia e Flora**, v.2. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.418-1279.
- MENGES, E. S. Restoration demography and genetics of plants: when is a translocation successful? **Australian Journal of Botany**, v.56, 2008. p.187-196.
- MILLACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R., (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 14 de junho de 2011.
- MILLAR, M. A.; BYRNE, M.; COATES, D. J.; STUKELY, M. J. C.; MCCOMB, J. A. Mating system studies in jarrah, *Eucalyptus marginata* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, v.48, 2000. p.475-479.
- MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMANN, 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**. Cidade do México: CEMEX, 2005. 392p.
- MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Mapas de cobertura vegetal dos biomas brasileiros**. Brasília, DF, 2007. 16p.
- 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**, n.74, 2007. p.75-86.
- MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Pollen dispersal between isolated trees in the Brazilian Savannah: a case study of the Neotropical tree *Hymenaea stigonocarpa*. **Biotropica**, v.43, n.2, 2011. p.192-199.
- MORAES, P. L. R. **Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees & Martius ex Nees (Lauraceae)**. Rio Claro, SP, 1997. 197p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Paulista.

- MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista brasileira de Botânica**, v.22, 1999. p.237-248.
- MORENO, M. A. **Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo**. Piracicaba, SP, 2009. 116p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- 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**, v.37, n.84, 2009. p.513-523.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, 2000. p.853–858.
- NAITO, Y. A.; KONUMA, A.; IWATA, H.; SUYAMA, Y.; SEIWA, K.; OKUDA, T.; LEE, S. L.; MUHAMMAD, N.; TSUMURA, Y. Selfing and inbreeding depression in seeds and seedlings of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). **Journal of Plant Research**, v.118, 2005. p.423-430.
- NEBEL, A.; FILON, D.; HOHOFF, C.; FAERMAN, M.; BRINKMANN, B.; OPPENHEIM, A. Haplogroup-specific deviation from the stepwise mutation model at the microsatellite loci DYS388 and DYS392. **European Journal of Human Genetics**, v.9, 2001. p.22-26.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, 1973. p.3321-3323.
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. **Annals of Human Genetics**, v. 41, 1977. p.225-233.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

- NEIGEL, J. E. Is FST obsolete? **Conservation Genetics**, v.3, 2002. p.167-173.
- NERI, A. V.; SOARES, M. P.; NETO, J. A. A. M.; DIAS, L. E. Espécies de Cerrado com potencial para recuperação de áreas degradadas por mineração de ouro, Paracatu, MG. **Revista Árvore**, v.35, n.4, 2011. p.907-918.
- NETO, J. D. G.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de uma população ‘*ex situ*’ de *Caesalpinia echinata* Lam. **Scientia Forestalis**, v.69, 2005. p.125-133.
- NG, K. K. S.; LEE, S. L.; SAW, L. G.; PLOTKIN, J. B.; KOH, C. L. Spatial structure and genetic diversity of three tropical tree species with different habitat preferences within a natural forest. **Tree Genetics and Genomes**, v.2, n.3, 2006. p.121-131.
- NOSS, R. F.; COOPERRIDER, A. Y. **Saving Nature's Legacy**. Washington: Island Press, 1994. 443p.
- O'GRADY, J. J.; REED, D. H.; BROOK, B. W.; FRANKHAM, R. Extinction risk scales better to generations than to years. **Animal Conservation**, v.11, 2008. p.442-451.
- OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. **Genetic Research**, v.22, 1973. p.201-204.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, 2006. p.294-307.
- OLIVEIRA, M. I. B.; SIGRIST, M. R. Fenologia reprodutiva, polinização e reprodução de *Dipteryx alata* Vogel. (Leguminosae-Papilionoideae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.2, 2008. p.195-207.
- PETIT, R. J.; MOUSADIK, A. E.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, v.12, n.4, 1998. p.844-855.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNEUT, J. J. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **The Journal of Heredity**, v.90, n.4, 1999. p.502-503.

- POTT, A.; POTT, V. J. Espécies de fragmentos florestais em Mato Grosso do Sul. In: Costa, R. B. (ed.). **Fragmentação Florestal e Alternativas de Desenvolvimento Rural na Região Centro-Oeste**. Campo Grande: UCDB, 2003. p.26-52.
- PRASANTH, V. P.; CHANDRA, S.; JAYASHREE, B.; HOISINGTON, D. AlleloBin - A program for allele binning of microsatellite markers based on the the algorithm of Idury and Cardon (1997). **Genome Research**, v.7, 2006. p.1104-1109.
- RAMOS, A. C. S. LEMOS-FILHO, J. P. D.; LOVATO M. B. Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. **Journal of Heredity**, v.100, n.2, 2009. p.206-216.
- RAMOS, A. C. S.; LEMES-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. A.; SANTOS, F. R.; LOVATO, M. B. Phylogeography of the Tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the Influence of Quaternary Climate Changes in the Brazilian Cerrado. **Annals of Botany**, v.100, 2007. p.1219-1228.
- RAMP, J. M.; COLLINGE, S. K.; RANKER, T. A. Restoration genetics of the vernal pool endemic *Lasthenia conjugens* (Asteraceae). **Conservation genetics**, v.7, 2006. p.631-649.
- RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A. Y.; WADT, L. H. O.; VEASEY, E. A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.9, 2007. p.1291-1298.
- REATTO, A.; CORREIA, J. R.; SPERA, S. T.; MARTINS, E. S. Solos do Bioma Cerrado: Aspectos Pedológicos. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (eds.). **Cerrado: Ecologia e Flora**, v.1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.107-149.
- REIS, C. A. F.; SOUZA, A. M.; MENDONÇA, E. G.; GONÇALVES, F. R.; MELO, R. M. G.; CARVALHO, D. Diversidade e estrutura genética espacial de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) em uma Floresta Paludosa. **Revista Árvore**, v.33, n.2, 2009. p.265-275.

- RIBAS, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Trema micrantha* (L.) B. **Scientia Forestalis**, v.66, 2004. p.66-75.
- RIBAS, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) B. considerando diferentes estádios de vida. **Scientia Forestalis**, v.65, 2004b. p.176-187.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As Principais Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (eds.). **Cerrado: Ecologia e Flora**, v.1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.151-212.
- RICE, K. J. & EMERY, N. C. Managing microevolution: Restoration in the face of global change. **Frontiers in Ecology**, v.1, n.9, 2003. p.469-478.
- RIZZINI, C. T. A flora do Cerrado. In: **Simpósio Sobre o Cerrado**, São Paulo, 1963. p.125-177.
- RIZZINI, C. T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil. Aspectos Ecológicos, Sociológicos e Florísticos**. 2º ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda, 1997. 747p.
- RODRIGUES, R. R.; LIMA, R. A. F.; GANDOLFI, S; NAVE, A. G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, 2009. p.1242–1251.
- RYMAN, N.; LAIKRE, L. Effects of Supportive Breeding on the Genetically Effective Population Size. **Conservation Biology**, v.5, n.3, 1991. p.325-329.
- SAMPSON, J. F.; HOPPER, S. D.; JAMES, S. H. The mating system and population genetic structure in a bird-pollinated mallee, *Eucalyptus rhodantha*. **Heredity**, v.63, 1989. p.383-393.
- SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.166, 2009. p.113–124
- SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Mapeamento da cobertura vegetal do Bioma Cerrado: estratégias e resultados. Planaltina, DF: **Documentos da Embrapa Cerrados**, v.190, 2007. 33p.

- SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, 2008. p.153-156.
- SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; DE BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. 52p.
- SANSALONI, C. P. **Desenvolvimento, caracterização e mapeamento de microssatélites de tetra e pentanucleotídeos em *Eucalyptus spp.*** Brasília, DF, 2008. 104p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Molecular.
- SATO, T.; ISAGI, Y.; SAKIO, H.; OSUMI, K.; SOTO, S. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity**, v.96, 2006. p.79-84.
- SCARIOT, A. Conseqüências da Fragmentação da Floresta na Comunidade de Palmeiras na Amazônia Central. **IPEF**, Piracicaba, SP, v.12, n.32, 1998. p.71-86.
- SCOLFORO, J. R.; CARVALHO, L. M. T. **Mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2006. 288p.
- SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas**. Piracicaba, SP, 1997. 107p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz.
- SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v. 14, n. 2, 2002. p.115-132.
- SEBBENN, A. M. Sistemas de reprodução em espécies tropicais e suas implicações para seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. (coords.). **Pomares de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p.93-108.

- SEBBENN, A. M. Tamanho efetivo para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista Instituto Florestal de São Paulo**, v.15, 2003. p.147-162.
- SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, v.58, 2000. p.25-40.
- SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.25, 2006. p.2540-2568.
- SILVA, F. A. M.; ASSAD, E. D.; EVANGELISTA, B. A. Caracterização Climática do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (eds.). **Cerrado: Ecologia e Flora**, v.1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.69-88.
- SILVA, J. A.; SALOMÃO, A. N. Coleta e conservação de germoplasma de espécies arbóreas: aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem.) braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) e gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium* Schott). In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (eds.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p.411-434.
- SILVA, T. A.; PINTO, L. V. A. Identificação de árvores matrizes de seis espécies alógamas em um fragmento florestal visando a produção de mudas com variabilidade genética. **Revista Agrogeoambiental**, 2009. p.56-62.
- SILVA-JÚNIOR, M. C. **100 Árvores do Cerrado**. Brasília: Ed. Rede de Sementes do Cerrado, 2005. 278p.
- SILVA-MONTELLANO, A.; EGUIARTE, L. E. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguillain* the Chihuahuan Desert I: Floral characteristics, visitors and fecundity. **American Journal of Botany**, v.90, 2003a. p.377-387.

- SILVA-MONTELLANO, A.; EGUIARTE, L. E. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert II: Genetic variation, differentiation and inbreeding estimates. **American Journal of Botany**, v.90, 2003b. p.700-706.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, 1995. p.457-462.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v.236, 1987. p.787-792.
- SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; RESENDE, L. V. Distribuição espacial da variabilidade genética intrapopulacional de *Dipteryx alata*. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, 2008. p.1151-1158.
- 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**, v.132, 2008b. p.9-19.
- SOARES, T. N.; MELO, D. B.; RESENDE, L. V.; VIANELLO, R. P.; CHAVES, L. J.; COLLEVATTI, R. G.; TELLES, M. P. C. Development of microsatellite markers for the neotropical tree species *Dipteryx alata* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, 2012. p.72-73.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, J. **Biometry**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1969. 340p.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto, SP: Ed. Holos, 2001. 202p.
- SOUZA, L. M. F. I. **Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* A.St.-Hil. (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) - Brasil**. Piracicaba, SP, 1997. 76p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz.

- 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**, v.33, n.1, 2010. p.78-85.
- THUM, A. B.; COSTA, E. C. Entomofauna visitante das inflorescências de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassm. (Palmae). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, v.5/6, 1998/1999. p.43-47.
- TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v.10, 2000. p.967-981.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. F. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, 2004. p.535–538.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. F. **Micro-Checker User Guide**. The University of Hull, 2003. 28p.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v.13, 2004. p.921-935.
- VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, v.43, 2003. p.1912-1921.
- VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Revista brasileira de genética**, v.15, n.1, 1992. p.53-60.
- VENCOVSKY, R. NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A. J. F. Amostragem em Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L. L. **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.231-280.
- VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **IPEF**, v. 35, 1987. p.79-84.

- VINSON, C. C.; RIBEIRO, D. O.; HARRIS, S. A.; SAMPAIO, I.; CIAMPI, A. Y. Isolation of polymorphic microsatellite markers for the tetraploid *Dipteryx odorata*, an intensely exploited Amazonian tree species. **Molecular Ecology Resources**, v.9, 2009. p.1542-1544.
- WALSH, J. B. How often do duplicated genes evolve new functions? **Genetics**, v.139, 1995. p.421-428.
- WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; JENKINS, T. M. Microsatellite markers in plants and insects. Part I. Applications of biotechnology. **Genes, Genomes and Genomics**, v.3, 2009. p.54-67.
- WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n . (dGdT)_n polymorphisms. **Genomics**, v.7, 1990. p.524-530.
- WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: North Caroline State University, Sinauer Associates Inc. Pub. 1996. 445p.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, 1984. p.1358–1370.
- WHITE, T. L.; ADAMS, W. T.; NEALE, D. B. **Forest Genetics**. Cambridge: Ed. CABI, 2007. 702p
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, 1931. p.97-159.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, 1943. p.114-138.
- WRIGHT, S. Size of population and breeding structure in relation to evolution. **Science**, v.87, 1938. p.430-431.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, n.4, 1951. p.313-354.
- YEH, F. C. Population Genetics. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (eds.). **Forest Conservation Genetics: Principles and Practice**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. p.21-37.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** Piracicaba, SP, 2002. 148p. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.