

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

**Estrutura genética populacional em lobeira (*Solanum lycocarpum* A.
St.-Hil., Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado
de Goiás**

Tânia Maria de Moura

**Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ecologia Aplicada**

**Piracicaba
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tânia Maria de Moura
Licenciada em Ciências – Habilitação Biologia

**Estrutura genética populacional em lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St. Hil.,
Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás**

Orientador:
Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

**Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ecologia Aplicada**

Piracicaba
2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Moura, Tânia Maria de

Estrutura genética populacional em lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hil., Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás / Tânia Maria de Moura. - - Piracicaba, 2007.
97 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Cerrado 2. Genética de populações 3. Marcador molecular 4.
Solanaceae I. Título

CDD 634.97

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

Aos meus avós Antônio João de Moura e Maria Rosa de Moura (*in memoriam*),
dedico.

Aos meus sobrinhos, Giovana e Eduardo, e,
aos meus pais, José Ovídio e Suelina,
Ofereço.

Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos. (Vinícius de Moraes).

E agradeço especialmente:

A Deus!

Aos meus pais, que em todos os momentos estiveram presentes, me incentivando, auxiliando e acreditando. Que fizeram do meu sonho os seus, e sacrificaram seus desejos para a conclusão desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, pela orientação. Digo pela orientação que se iniciou com a admiração quando ainda estava na graduação e que me fez pedir orientação, pela confiança quando aceitou me orientar, por ter me recebido em seu laboratório, pelas vezes que discutiu meu projeto comigo, por ter esclarecido dúvidas, por ter me apoiado do primeiro ao último dia, pela compreensão e pela paciência. Registro aqui meu respeito, admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Lázaro José Chaves, pelo auxílio nas coletas, correção da dissertação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier de Oliveira, por toda a ajuda, incentivo e paciência.

Ao Dr. Alexandre Sebben, pelo auxílio com os programas, auxílio com a escrita e correção da dissertação. Por instantes acredito que não haveria conseguido sem sua ajuda. Obrigada!

À Dra. Karina Martins, se não fosse por você não teria realizado esta conquista!

Ao Dr. Vinícius Castro Souza, pelo carinho e companhia.

Ao Dr. Roland Vencovsky, que sabiamente contribuiu sanando dúvidas.

Thannya Nascimento Soares, ao Dr. Alexandre Coelho, e à Andréa Raposo, pela ajuda na interpretação de alguns dados e pelo apoio.

À equipe LARGEA, Elza Ferraz, Maria Andréia Moreno, Gabriela Defavari, Sybelle Barreira, Flávio Gandara, Roberto Tarazi, Carolina, Guilherme (Moro), Pedro, Rodrigo, Márcia Patrícia, Daniela Talora, João (Cobrão) e Eduardo Gusson (Dodô), que me ensinaram e apoiaram durante a conclusão do estudo.

Elza (“chefinha” do Largea), obrigada pela paciência, pelos conselhos e pelas broncas.

Maria Andréia Moreno, (Deinha... uai, sei não!!!) palavras não expressam minha gratidão por você. Obrigada!

Dra. Sybelle Barreira, você foi um exemplo e meu alicerce no LARGEA, obrigada pelos conselhos, pelas broncas, pelo auxílio com a dissertação e acima de tudo pela amizade.

Gabi, você é um exemplo de paciência, delicadeza e dedicação. Aprendi muito com você, especialmente a ser mais cautelosa dentro do laboratório (risos). Obrigada pela paciência e amizade.

Roberto, obrigada pelo incentivo, ajuda com a dissertação e por acreditar em momentos que nem eu acreditava mais.

As equipes de coletas: meu pai (que esteve em todas), minha mãe, Lázaro José Chaves, Paulo Yoshio Kageyama, Andréia Moreno, Thannya Soares, e a equipe do Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, em especial ao Sr. Sebastião.

Ao Paulo Y. Kageyama, Cristina Rocha, Lázaro José Chaves e Marilene, pela visita em Morrinhos.

Eline Guimarães, pela companhia no laboratório nos finais de semana e pelos dados de isoenzimas.

A minha mãe e à prof. Leoneide por conseguirem os dados meteorológicos na UEG - UnU Morrinhos.

À Priscilla Villela, Karina Martins, Alexandre Sebben, Roberto Tarazi, Jalmar Carrasco e Edjane, pela amizade e ajuda na escolha e manuseio dos programas estatísticos.

A pré-banca LARGEA “Tabajara”, Elza, Sybelle, Gabriela, Roberto, Andréia e Giancarlo, foi uma grande expressão de amizade, obrigada por me apoiarem SEMPRE!

À amiga Janette Inamine Miachir, pelos momentos agradáveis que passamos juntas, em Piracicaba e em Gramado.

Carolina Morgante, que tantas vezes ouviu meus desabafos e me incentivou a continuar.

Às “irmãs”, Vânia, Edjane e Jaqueline, no qual convivemos juntas por um ano, com todo respeito, amizade e carinho que se encontra em verdadeiras irmãs.

Shirley Famelli, infelizmente lhe conheci somente no final do curso, mas será eterna na memória!

Selma Coelho e Sandra Zago Falone, pela amizade, incentivo, companheirismo, conselhos e lições nestes dois anos de convivência.

Tsai Siu Mui, por todo apoio dado no começo do estudo.

Ao Serviço Social e a Vila pós-graduação, que foi fundamental para minha estadia em Piracicaba; e a todos os moradores e amigos da Vila, pelos agradáveis e desagradáveis momentos.

Às primas Kathya Luce e Tathiana Luce, pela hospedagem em Brasília.

À amiga e orientadora de iniciação científica Maria Rita de Cássia Campos, por ter entrado em minha vida e ter se tornado um dos maiores presentes que Deus me confiou.

À Regina, secretária do programa de ecologia, que se tornou uma pessoa muito especial para mim.

Ao Jefferson, pelo auxílio com GPS e mapas.

Ao grupo de trabalho “Restoration International” (Victor Vera, Renata Carmona, Julio César (“sem rumo”), José Hamilton (Kalinfa), Andréia e Bruno) por ter sido o melhor grupo de trabalho, na melhor das disciplinas.

Aos demais amigos de Piracicaba, Claudia Coelho, Sergius Gandolf, Márcia (RN), Thiago Conforti, Cristina (PK), Pablo G. Soares, Sarah, Michelle Bordini, Ana Paula Branco do Nascimento, Júlio César e todos aqueles que participaram e contribuíram nesta jornada.

À Silvia e Elaine, que com paciência e compreensão auxiliaram na formatação dessa dissertação.

Aos amigos de Morrinhos:

Ademilton e Ana Lúcia, pela estadia na fazenda, pela paciência e pelo socorro ao deparar com vacas (risos).

À Andréia Aparecida, Érika Barbosa e Márcia Alexandre, pela amizade.

Débora de Jesus, que compreendeu minhas limitações com a UEG devido a minha dissertação, e pela confiança.

Aos meus alunos da UEG que foram sacrificados devido aos meus compromissos em Piracicaba e que compreenderam.

E a toda minha família, que esteve ao meu lado, me apoiou e entendeu... Em especial:

Minha irmã Thelma Maria de Moura, que teve de me suportar nos dias mais difíceis, mas que tantas vezes me ajudou.

Maria da Glória de Moura Naves e Ruby Naves, por tudo... especialmente pelo carinho, apoio emocional e financeiro.

Aos meus sobrinhos Giovana e Eduardo, que me faziam esquecer de todo o sacrifício, simplesmente por existirem.

Aos meus tios e padrinhos, Izídio Martins de Moura e Maria da Luz de Moura, pelo apoio.

Ao meu tio, Adeir Marra da Fonseca (Xeda), *in memoriam*, pelo carinho de toda uma vida!

À Vanilda de Aquino Silva, Maria Helena e Ana Paula Zago, por cuidarem da minha casa e família.

Mais uma vez aos meus pais, que custearam meus estudos nestes dois anos sem bolsa.

E a todos aqueles que não citei aqui, mas que estão guardados na memória.

Esta foi mais uma conquista, que não haveria conseguido sem vocês.

“Depois de algum tempo você aprende que não se deve se comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.”

William Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 O bioma Cerrado	19
2.2 Sistema de reprodução em plantas do Cerrado	21
2.3 Diversidade genética em espécies de plantas	23
2.4 Marcadores moleculares.....	25
2.4.1 Aspectos gerais.....	25
2.4.2 Marcadores moleculares microssatélites	26
2.4.3 Marcadores moleculares isoenzimáticos.....	28
2.5 A lobeira.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Biologia reprodutiva	34
3.1.1 Área de estudo.....	34
3.1.2 Coleta de dados	34
3.1.3 Análise estatística	35
3.2 Estrutura genética populacional.....	36
3.2.1 Amostragem.....	36
3.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico	38
3.2.3 Locos microssatélites	38
3.2.4 Reações de amplificação, eletroforese dos fragmentos amplificados e interpretação dos géis.....	39
3.2.5 Marcadores isoenzimáticos.....	40
3.2.6 Análise estatística	42
3.2.6.1 Caracterização dos locos e diversidade genética	42
3.2.6.2 Estrutura genética	42
3.2.6.3 Taxa de cruzamento.....	44
3.2.6.4 Padrão espacial da estrutura genética intrapopulacional	44
3.2.6.5 Tamanho efetivo populacional	46
4 RESULTADOS	49
4.1 Biologia reprodutiva	49
4.2 Diversidade genética	52
4.2.1 Marcadores microssatélites.....	52
4.2.2 Freqüências alélicas.....	53
4.2.3 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg	55
4.2.4 Diversidade genética intrapopulacional.....	55
4.2.5 Estrutura genética e fluxo gênico	56
4.2.6 Distância genética e isolamento pela distância.....	58
4.3 Marcadores isoenzimáticos	59
4.3.1 Caracterização dos locos	59
4.3.2 Freqüências alélicas.....	60
4.3.3 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg	61

4.3.4	Diversidade genética intrapopulacional.....	62
4.3.5	Estrutura genética	62
4.4	Taxa de cruzamento.....	63
4.5	Padrão espacial da estrutura genética intrapopulacional	64
4.6	Tamanho efetivo populacional	66
5	DISCUSSÕES.....	68
5.1	Biologia reprodutiva	68
5.2	Diversidade genética nos locos SSR em <i>S. lycocarpum</i>	71
5.3	Diversidade genética intrapopulacional	72
5.4	Estrutura genética populacional	76
5.5	Taxa de cruzamento e distribuição espacial intrapopulacional	79
5.6	Tamanho efetivo populacional	82
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
	REFERENCIAS.....	86

RESUMO

Estrutura genética populacional em lobeira (*S. lycocarpum* A. St.-Hil, Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás

Solanum lycocarpum A.St.-Hil. (Solanaceae) é uma espécie de ampla distribuição no bioma Cerrado. Popularmente conhecida com fruta-do-lobo, devido ao fato de o lobo-guará consumir frequentemente os frutos desta planta, sendo este seu principal agente dispersor de sementes. É utilizada pela população local para fabricação de doces, e empiricamente como medicinal. A espécie floresce e frutifica durante todo o ano, característica que permite constante fluxo de genes via pólen e sementes. Ocupa facilmente ambientes antropizados, o que permite que seja utilizada em projetos de restauração. O presente estudo teve como objetivo, caracterizar a estrutura genética populacional de *S. lycocarpum* em ambientes naturais e antropizados, utilizando dois marcadores moleculares: microssatélites (SSR) e isoenzimas. Foram estudadas quatro populações com SSR, e duas populações com Isoenzimas, formando pares de populações (uma natural e outra antropizada). As populações estudadas com marcadores SSR estavam situadas duas a Nordeste do Estado de Goiás e outras duas a Sul do estado. As duas populações estudadas com isoenzimas localizavam-se a Sul de Goiás. Coletou-se aleatoriamente amostras de 60 indivíduos em cada população, exceto na população antrópica estudada com marcador Isoenzimático, que foram amostrados 41 indivíduos. As amostras foram conduzidas ao LARGEA – ESALQ/USP, onde foram realizados os procedimentos laboratoriais. A análise dos dados consistiu em quantificar a diversidade genética e sua distribuição entre e dentro das populações. Embora os valores do índice de fixação tenham sido algumas vezes altos, não foram detectados valores significativos em nenhuma das populações para ambos os marcadores, sugerindo ausência de endogamia nas populações estudadas. As populações naturais estudadas com locos SSR apresentaram número de alelos por loco mais elevados que as populações antropizadas. Uma população situada em uma unidade de conservação foi a que apresentou maior número de alelos por locos e maior número de alelos exclusivos, o que permite sugerir que unidades de conservação abrigam maior diversidade genética que populações com influência antrópica. Utilizando o teste X^2 foi possível confirmar que o número de alelos encontrados nas populações naturais é significativamente mais elevado que os encontrados no outro tipo de ambiente. O mesmo não foi verificado para as populações estudadas com locos isoenzimáticos. A divergência genética entre as populações foi substancial, significativamente diferentes de zero e semelhantes para ambos os marcadores ($\theta_p = 0,095$ e $\theta_p = 0,081$ para marcadores SSR e Isoenzimáticos, respectivamente). A divergência genética entre as populações medida pela estimativa $G_{ST(Hedrick)}$, que considera tanto o tipo como a frequência dos alelos, apresentou valores superiores para os dois marcadores (SSR=0,167 e Isoenzimáticos= 0,102), indicando maior restrição no fluxo gênico histórico se comparado com as estimativas obtidas da estatística F_{ST} . O presente estudo permite sugerir que existe diferença na estrutura genética entre áreas

sob intervenção antrópica e aquelas com intervenção restrita, havendo nas áreas mais preservadas maior diversidade genética. Os resultados obtidos com a estimativa $G_{ST(Hedrick)}$ possibilitam propor que mesmo em espécies de ampla distribuição e que frequentemente ocupam ambientes de ação antrópica, como a lobeira, pode estar ocorrendo restrição de fluxo gênico e apontam maior diferenciação entre populações de lobeira do que relatado em estudos anteriores.

Palavras- chave: Lobeira; Cerrado; Estrutura genética

ABSTRACT

Population genetic structure of lobeira (*S. lycocarpum* A. St.-Hil, Solanaceae), in natural and anthropogenic environmental in State of Goiás

Solanum lycocarpum A. St.-Hil. (Solanaceae) has a wide distribution in savanna biome. The species is common know as “fruta-do-lobo” due the “lobo-guará” frequently to eat your fruits. “Lobo-guará” is also the main seed disperser of the species. The species is used for local people to manufacture sweets and as medicine. The species flowering and produce fruits during all year, favoring pollen and seed gene flow. The species colonize easily anthropized environments, permitting your use in environmental restoration projects. The goal of this study was to characterize the genetic structure of *S. lycocarpum* in natural and anthropized populations, using two different kinds of genetic markers: microsatellites (SSR) and allozymes. Four populations were studied using SSR markers and two using allozyme markers, forming pair of populations (a natural and an anthropized). Two populations studied by SSR markers were located in Northeast of Goiás State and two in South of the State. The two South populations were also studied by allozyme markers. Samples were randomly collected from 60 individuals in each population, with exception in one anthropized population study by allozymes, where 41 individuals were sampled. The samples were envied to LARGEA – ESALQ/USP, where the Lab analyses were made. The genetic diversity and distribution among and within populations was quantified. Although fixation index values were highest in some populations, these values were not statistically different from zero for both used genetic markers, suggesting absence of inbreeding in the studied populations. For SSR markers, natural populations showed higher number of alleles per locus than anthropized populations. A population located in a conservation unity presents the highest number of alleles per locus and exclusive alleles, suggesting that this population have higher genetic diversity than anthropized populations. According to a X^2 test, the number of SSR alleles was significantly higher that detected in anthropized population. The same was not observed for population studied by allozyme loci. The genetic divergence among populations was substantial and significant different from zero for both used genetic markers ($\theta_p=0.095$ and $\theta_p=0.081$ for SSR and allozymes, respectively). The genetic divergence measured by $G_{ST(Hedrick)}$ statistic, that considerer simultaneously the kinds of alleles and gene frequency was higher for both genetic markers (SSR=0.167 and allozymes= 0.102), indicating lower historic gene flow than measured by F_{ST} statistic. The present study suggested that there are differences in genetic structure between natural and anthropized populations, where natural populations have more genetic diversity. The results from $G_{ST(Hedrick)}$ statistic suggested that even species with wide geographic distribution and which frequently colonizing anthropized environments, as lobeira, can experience restriction in gene flow. The present results also indicate higher genetic differentiation among population than has been related in previous population study with this species.

KeyWords: *S. lycocarpum*; Cerrado; Genetic structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da abrangência do Bioma Cerrado no território brasileiro. Fonte: (Embrapa 2005).....	19
Figura 2 – Indivíduo de <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil.	30
Figura 3 – Flores (a) e frutos (b) de <i>Solanum lycocarpum</i>	31
Figura 4 – (A) Mapa do Brasil, indicando os estados brasileiros (IBGE, 2005); (B) Estado de Goiás, apontando a localização da Pop3 (Ma); (C) Distribuição espacial dos indivíduos de <i>S. lycocarpum</i> estudados na Pop3 (Ma)	34
Figura 5 – Localização geográfica das quatro populações de <i>S. lycocarpum</i> estudadas com marcador microssatélite no Estado de Goiás	37
Figura 6 – Localização geográfica das duas populações de <i>S. lycocarpum</i> estudadas com marcador isoenzimas no Sul do Estado de Goiás	41
Figura 7 – Número de pares de pontos para cada uma das seis classes de distância geográfica (m) entre 60 plantas de lobeira localizadas na população 1 (Pa) estudadas com os locos SSR. No.= número de pares. Distância espacial apresenta o limite superior das classes de distância.....	45
Figura 8 – Número de pares de pontos para cada uma das sete classes de distância geográfica (m) entre 60 plantas de lobeira localizadas na população 4 (Mn) estudadas com os locos SSR e Isoenzimáticos. No.= número de pares. Distância espacial apresenta o limite superior das classes de distância.....	46
Figura 9 – Quantidade de flores abertas e produção de frutos em <i>S. lycocarpum</i> em uma população em Morrinhos, GO, no período de junho de 2005 a junho de 2006	51
Figura 10 – Perfil dos genótipos microssatélites do loco CA158 na população natural de <i>S. lycocarpum</i> em Caldas Novas (Pop4). Gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata	52
Figura 11 – Distograma construído para a população 1 (Pa), a partir das distâncias genéticas médias entre 60 plantas de lobeira distribuídas em seis classes de distância geográfica, estudadas com locos SSR. D= Distância genética.....	65
Figura 12 – Distograma construído para a população 4 (Mn), a partir das distâncias genéticas médias entre 60 plantas de lobeira distribuídas em sete classes de distância geográfica, estudadas com locos SSR. D= Distância genética.....	65
Figura 13 - Distograma construído para a população 4 (Mn), a partir das distâncias genéticas médias entre 60 plantas de lobeira distribuídas em sete classes de distância geográfica, estudadas com locos Isoenzimáticos. D= Distância genética.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Temperatura de anelamento (T_m), seqüência de cada par de <i>primers</i> e motivo da repetição..	39
Tabela 2 - Resultados referentes a valores mensais de porcentagem de plantas com flores e frutos, e média destes na população	49
Tabela 3 - Valores encontrados para produção mensal de flores e frutos, e variáveis climáticas: precipitação, temperatura e umidade relativa do ar	50
Tabela 4 - Resultados referentes a Correlação de Spearman (r_s)	51
Tabela 5 - Genética descritiva dos locos microssatélites considerando os indivíduos de todas as populações conjuntamente. n = número de indivíduos amostrados, A = número de alelos, A_e = número efetivo de alelos por loco, H_e = diversidade gênica, h_{max} = diversidade máxima, H_e / h_{max} = proporção de diversidade máxima (em%).....	53
Tabela 6 - Frequência dos alelos nos cinco locos microssatélites nucleares nas populações estudadas e número de indivíduos amostrados.....	54
Tabela 7 – Valores encontrados para o teste X^2 , para as populações estudadas com locos SSR	55
Tabela 8 - Probabilidades exatas (Teste Exato de Fisher) dos desvios das proporções de Hardy-Weinberg em locos microssatélites nucleares nas populações de <i>S. lycocarpum</i>	55
Tabela 9 - Estimativa de diversidade genética para as quatro populações estudadas. n = número de indivíduos; A = número de alelos por loco; H_e = diversidade gênica; H_o = heterozigosidade observada; f = índice de fixação	56
Tabela 10 – Estatísticas F (método Weir & Cockerham, 1984) para quatro populações de <i>S. lycocarpum</i> . f = índice de fixação; F é o índice de fixação total para o conjunto das populações; θ_p é a divergência genética entre as populações; R_{ST} = divergência entre as populações; $G_{ST(Hedrick)}$ é a divergência genética média entre as populações baseado no método de Hedrick (2005)	57
Tabela 11 - Distância genética (θ_p , R_{ST} e $G_{ST(Hedrick)}$) e fluxo gênico (Nm) entre pares de populações. Entre parênteses há o intervalo de confiança a 95% por meio de 10000 reamostragens “bootstrap” sobre locos	58
Tabela 12 - Genética descritiva dos locos isoenzimáticos. n = número de indivíduos amostrados; A = número de alelos por locos; A_e = número de alelos efetivos por locos; H_e = diversidade gênica; H_o = heterozigosidade observada; h_{max} = diversidade máxima; H_e / h_{max} = proporção de diversidade máxima (em%).....	60
Tabela 13 - Frequência dos alelos nos sete locos isoenzimáticos nas duas populações estudadas; n = número de indivíduos amostrados.....	61
Tabela 14 - Probabilidades exatas (Teste Exato de Fisher) dos desvios das proporções de Hardy-Weinberg em locos isoenzimáticos em duas populações de <i>S. lycocarpum</i>	62
Tabela 15 - Estimativa de diversidade genética para as duas populações estudadas com locos isoenzimáticos. n = número médio de indivíduos; A = número médio de alelos por loco; H_e = diversidade gênica; H_o = heterozigosidade observada; f = índice de fixação	62
Tabela 16 - Estatísticas F (Método Weir & Cockerham, 1984) para duas populações de <i>S. lycocarpum</i> estudadas com locos isoenzimáticos. f = índice de fixação médio; F = índice de fixação total para o conjunto das populações; θ_p = divergência genética entre as populações. $G_{ST(Hedrick)}$ é a divergência genética média entre as duas populações baseado no método de Hedrick (2005)	63

- Tabela 17 – Taxa de cruzamento aparente nas populações de *S. lycocarpum* estudadas com marcadores microssatélites e isoenzimáticos. f = índice de fixação; t_a = taxa de cruzamento aparente 64
- Tabela 18 – Tamanho efetivo populacional calculado para cada população, baseado nas amostras coletadas. n = número de indivíduos amostrados; f = coeficiente de endogamia; N_e = tamanho efetivo calculado67
- Tabela 19 – Estimativas populacionais de conservação *in situ*: $N_{e(v)}$ obtido para o conjunto de populações; S é o número de populações que devem ser conservadas para obter um tamanho efetivo de 500 conforme $N_{e(ref)}$ 67
- Tabela 20 – Estimativa do índice de diversidade por loco SSR em espécies arbóreas tropicais. n =tamanho da amostra; nl = número de locos; A = média do número de alelos por loco; $\hat{A}_e = 1/(1 - \hat{H}_e)$ = número efetivo de alelos por loco; H_e = Heterozigosidade esperada; H_o = Heterozigosidade observada72

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma extensão de aproximadamente 1,8 milhões de km² (AGUIAR et al. 2004). Além de apresentar grande diversidade de espécies (FELFILI et al. 2001) pelo menos 30% do total supostamente existente no Brasil (AGUIAR et al. 2004) com elevado índice de endemismo (MYERS et al. 2000).

É composto por formações vegetais que variam desde campos abertos até formações florestais, cuja cobertura arbórea e densidade de árvores podem variar significativamente entre fisionomias, formando um gradiente entre áreas campestres e florestais (AGUIAR et al. 2004). Os principais determinantes das fisionomias deste bioma foram considerados por Felfili et al. (2001) como sendo a altitude e a latitude, seguidos pela classe de solos. Cada um dos tipos fisionômicos é considerado por Henriques (2005) como um clímax, que na ocorrência de fogo regride para uma fisionomia mais aberta.

Nos últimos 40 anos, o Cerrado vem sendo explorado de forma rápida e extensiva (LIMA; SILVA, 2005), principalmente para formação de pastos, lavouras e carvoarias; estima-se uma perda média anual de 9,75 milhões de hectares (AGUIAR et al. 2004). Myers et al. (2000) e Felfili et al. (2005) comentam que áreas antrópicas do Cerrado já atingem 80% da área original do bioma.

Uma importante forma de avaliar as conseqüências da perda de habitat são os estudos genéticos em populações, pois permitem, entre outros, estimar a perda de alelos e/ou ocorrência de endogamia dentro das populações.

A lobeira do cerrado, *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. é uma espécie nativa do Cerrado que apresenta grande importância ecológica como fonte de alimento para animais silvestres (ALMEIDA et al. 1998), em especial o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), considerado dispersor natural das sementes, pois consome seus frutos durante todo o ano, praticamente não danificando as sementes que consome, e as defeca em locais em que a planta ocorre freqüentemente (MARTINS; MOTTA JR., 2000).

Solanum lycocarpum ocorre em abundância nos Cerrados, principalmente em áreas degradadas (SILVA JUNIOR, 2005). Seus frutos possuem sementes

numerosas de emergência fácil e rápida (ALMEIDA et al. 1998), apresenta crescimento rápido e resistência à seca e ocorre em solos de baixa fertilidade. Martins (2005) comenta que a espécie apresenta amplo potencial para plantio em planos de restauração. Esta espécie também é utilizada pelo homem como ornamental e em sua dieta, para fabricação de doces, ou como medicinal (ALMEIDA et al. 1998). Pode também ser considerada como espécie indicadora da ocorrência da intervenção humana (MARTINS, 2005).

Martins et al. (2006) apresentam a transferência de *primes* de *Capsicum* spp. (Solanaceae), para *S. lycocarpum*. Poucos locos, com baixo polimorfismo foram obtidos. Por esta razão neste estudo foi utilizado, além dos *primes* transferidos pelos citados autores, locos isoenzimáticos para garantir maior confiabilidade aos dados.

O presente estudo visa verificar algumas características reprodutivas de *S. lycocarpum* e averiguar a estrutura genética populacional, com ênfase no sistema de reprodução, fluxo gênico e comparação da estrutura genética em áreas naturais e antropizadas.

1.1 Objetivos

- Quantificar a diversidade genética e sua distribuição entre e dentro de populações;
- Estimar o fluxo gênico aparente;
- Comparar a diversidade genética em populações naturais com aquela encontrada em áreas antropizadas;
- Comparar os resultados obtidos com marcador SSR e Isoenzimáticos;
- Realizar um estudo sobre a influência dos fatores ambientais - temperatura, umidade e precipitação - na floração e frutificação de *S. lycocarpum*.

1.2 Hipóteses

- a) A diversidade genética em populações naturais é significativamente maior do que em populações de ambientes antropizados;
- b) Não há restrição de fluxo gênico mesmo entre populações distantes, acarretando baixos índices de divergência genética entre os mesmos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O bioma Cerrado

O bioma Cerrado é a maior savana do mundo e ocupa uma área que corresponde a aproximadamente 24% do território nacional (LIMA; SILVA, 2005). Ocupa extensa área contínua no Brasil Central e áreas disjuntas em outros biomas (HENRIQUES, 2005). Há enclaves de Cerrado na Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica, que são remanescentes de um processo histórico e dinâmico de contração e expansão das áreas de Cerrado e florestas, provocadas por alterações climáticas existentes no passado (AGUIAR et al. 2004). Corta o Brasil diagonalmente no sentido nordeste-sudoeste (Figura 1) e limita-se com quase todos os biomas, exceção apenas para campos sulinos e ecossistemas costeiros e marinhos (AGUIAR et al. 2004). Contém as três maiores bacias hidrográficas do continente Sul Americano (FELFILI; SILVA JUNIOR, 2005), a Amazônica, do Paraná e a do São Francisco (CHAVES, 2001).



Figura 1 – Representação da abrangência do Bioma Cerrado no território brasileiro. Fonte: (Embrapa 2005)

Ocorrem formações florestais, savanas lenhosas e campestres, formando várias fisionomias conhecidas por cerrado sentido restrito, cerradão, mata de galeria, campos e vereda (FELFILI et al. 2004). O cerrado sentido restrito ocupa aproximadamente 70% do bioma (FELFILI; SILVA JUNIOR, 2005).

Pesquisas sobre diversidade biológica do Cerrado brasileiro ainda são incipientes, mas há uma estimativa de que nesse bioma esteja contida metade das espécies de aves, 45% dos peixes, 40% dos mamíferos e 38% dos répteis do Brasil (AGUIAR et al. 2004). Dias (1996) estima que 30% de todas as espécies que existem no Brasil componham essa biota. Esta riqueza de espécies pode ser explicada pelo mosaico natural de ecossistemas (AGUIAR et al. 2004). De acordo com Mendonça et al. (1998), as espécies vegetais do bioma estão distribuídas em torno de 35% no cerrado sentido restrito, 30% são de mata de galeria, 25% de áreas campestres e 10% ainda não classificadas.

Apresenta grande diversidade e muitas espécies endêmicas em todas as fisionomias em níveis comparáveis às florestas Atlântica e Amazônica (FELFILI et al. 2001). De acordo com Myers et al. (2000), há 10.000 espécies de angiospermas e um índice de 44% de endemismo para plantas vasculares.

O clima é sazonal, com invernos secos e verões chuvosos (FRANCO, 2005). A estação seca pode durar até seis meses, quando a camada superficial do solo tende a secar, mas as camadas mais profundas mantêm-se úmidas durante todo o ano (EITEN, 1972). Mudanças de pluviosidade, temperatura, fotoperíodo e ocorrência de fogo devem funcionar como “gatilhos” ambientais sinalizando a ocorrência de floração, mas não como determinantes estritos (OLIVEIRA, 1998b).

Há grande número de espécies com potencial econômico, podendo ser alimentícias, ornamentais, forrageiras, apícolas, produtoras de madeira, cortiça, fibra, óleo, tanino e artesanato, e é o terceiro maior provedor de plantas medicinais no Brasil (FELFILI et al. 2004).

Atividades extrativistas exercidas por comunidades locais e indústrias farmacêuticas têm contribuído para o declínio da vegetação natural, além do extrativismo através das carvoarias, que destroem a vegetação, e podem resultar em escassez dos recursos naturais (FELFILI et al. 2004).

Atualmente, a região ocupada pelo Cerrado representa a principal produtora de grãos e de gado de corte do país, o que resultou em grande devastação da vegetação nas últimas décadas (AGUIAR et al. 2004). Há a estimativa de que 80% da vegetação original já tenha sido alterada (MYERS et al. 2000; FELFILI et al. 2005).

O percentual de Cerrado que se encontra protegido em Unidades de Conservação representa pouco mais de 3% de sua área original (AGUIAR et al. 2004). Cerca de 20% das espécies ameaçadas deste bioma não são protegidas pelas Unidades de Conservação (ALHO, 2005).

Em 1998, houve um seminário para definição das áreas prioritárias para a conservação do Cerrado e do Pantanal, organizado pelo Ministério do Meio Ambiente. No seminário, foi proposta uma série de medidas para conservação desses biomas, dentre elas a ampliação do número de Unidades de Conservação. Em 2001, o Governo Federal começou a criar as Unidades de Conservação sugeridas em 1998 (AGUIAR et al. 2004). Mas muito ainda deve ser feito para que realmente se preserve a diversidade biológica do Cerrado. O estabelecimento de áreas protegidas é apenas uma das medidas necessárias para a real conservação do Cerrado. De acordo com Ribeiro et al. (2005), ainda é necessário gerar e disponibilizar informações científicas para o estabelecimento de políticas públicas apropriadas e eficientes.

2.2 Sistema de reprodução em plantas do Cerrado

Pouco foi estudado sobre reprodução de plantas do Cerrado. Inicialmente, considerava-se que plantas desse bioma reproduziam-se quase que exclusivamente por propagação vegetativa. Entretanto, a propagação de plantas do Cerrado por meio de sementes, em condições naturais, tem se apresentado viável e muito freqüente (MELO et al. 1998).

As raízes de plantas lenhosas do Cerrado são muito profundas, alcançando até 20 metros de profundidade. Normalmente apresentam raízes laterais que se desenvolvem paralelas à superfície do solo e contêm gemas que, após alguns estímulos, como o fogo, formam novos ramos. Em ambientes perturbados, a propagação vegetativa a partir de estruturas radiculares pode ser importante

mecanismo para multiplicação de algumas espécies (MELO et al. 1998), e tem vantagens adaptativas, principalmente na colonização de novos ambientes, em que indivíduos com combinações genéticas favoráveis podem rapidamente ocupar nichos ecológicos (VALOIS et al. 2001). Rodrigues et al. (2004) observaram que existe relação entre rebrota a partir de raízes e ação de distúrbios. Estes autores ainda comentam que a rebrota influencia na ocupação espacial e na estrutura de espécies arbóreas com este potencial de regeneração. No entanto, espécies do Cerrado também têm apresentado nível de xenogamia obrigatório tão ou mais elevado que em florestas tropicais (OLIVEIRA, 1998a).

A época reprodutiva de espécies de Cerrado geralmente coincide com a estação seca, sincronizando a germinação de sementes no início da estação chuvosa; assim, quando chega a seca, a planta já está com o sistema radicular bem desenvolvido, embora seja comum que algumas plantas se reproduzam em outras épocas do ano (OLIVEIRA, 1998b). Este autor comenta que, em plantas lenhosas do Cerrado, as estratégias fenológicas não são determinadas exclusivamente por variações sazonais.

O ajustamento das diferentes épocas de floração e dispersão de sementes, o tempo de maturação dos frutos e a presença de mecanismos de dormência são fatores que permitem a germinação das espécies no período ótimo para desenvolvimento e dispersão dos frutos e estabelecimento da planta (OLIVEIRA, 1998b). Segundo Franco (2005), a seca sazonal parece não afetar significativamente a sobrevivência de plântulas de espécies lenhosas desse bioma. *Tabebuia* sp., por exemplo, é uma planta que apresenta floração tardia, já que o florescimento, o desenvolvimento e a maturação dos frutos ocorrem na estação seca, e o desenvolvimento de folhas novas ocorre após o período reprodutivo (OLIVEIRA, 1998b).

Em estudo sobre síndrome de dispersão em espécies arbóreas, Vieira et al. (2002) não encontraram grandes diferenças na síndrome de dispersão em áreas de Cerrado, relatando ainda que a média das proporções de zoocoria foi de 56,7% e que a autocoria é uma estratégia de dispersão raramente encontrada no Cerrado. Existem

diferentes padrões de floração e frutificação para espécies disseminadas pelo vento e por animais (OLIVEIRA, 1998b).

Os animais silvestres agem como dispersores naturais de sementes, podendo-se admitir que o caráter atrativo e alimentício dos frutos resulta em um processo de co-evolução entre plantas e animais por um longo período de tempo (CHAVES, 2001).

2.3 Diversidade genética em espécies de plantas

A diversidade genética é a variação hereditária devida à constituição genética dos indivíduos de uma população, sendo responsável por parte das suas diferenciações fenotípicas (TORRES et al. 2000). Para conservação da diversidade genética, é necessária a proteção dos ecossistemas, pois a redução no tamanho das populações freqüentemente afeta sua estrutura genética.

A perda da biodiversidade compromete a possibilidade do uso sustentável dos recursos genéticos. Chaves (2001) relata estudos com espécies do Cerrado e mostra que a maioria delas apresenta variabilidade genética estruturada no espaço, exigindo uma amostragem ampla para fins de conservação. A existência de um padrão espacial na variação genética é importante para compreensão de como ocorre a dinâmica dos alelos entre as subpopulações (TELLES et al. 2001).

Toda população natural está sujeita à fragmentação, não havendo como predeterminar uma forma específica de mudança nas freqüências alélicas nas populações resultantes (FERNANDES-MATIOLI, 2001). Em ambiente não mutável, a redução nos tamanhos das populações de uma espécie alógama pode resultar na depressão por endogamia e perda de adaptação (FUTUYMA, 2002).

O fluxo gênico é o movimento dos alelos dentro e entre populações e contribui para o aumento da diversidade genética, pois introduz novas combinações alélicas na população.

Vários fatores evolutivos tais como seleção e deriva genética, podem trazer conseqüências para a estrutura genética de populações, afetando sua dinâmica (GAIOTTO, 2001; FERNANDES-MATIOLI, 2001). A deriva genética é a alteração ao

acaso das frequências alélicas (STEARNS; HOEKSTRA, 2003), e pode ocasionar a perda de alelos e redução da variabilidade genética dentro da população (SCHNEIDER, 2003).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com espécies nativas do Cerrado, e apontam que as espécies deste bioma são preferencialmente alógamas, como encontrado em *Caryocar brasiliense* (OLIVEIRA, 1998; COLLEVATTI et al. 2001); *Eugenia dysenterica* (ZUCCHI et al. 2003); *Annona crassiflora* (TELLES et al. 2003); *Solanum lycocarpum* (MARTINS, 2005); *Eremanthus erythropappus* (BARREIRA, 2005) e *Dipterix alata* (SOARES et al. 2007). A diferenciação genética foi registrada em 25% entre populações de *Eugenia dysenterica* (ZUCCHI et al. 2003) e 19% em *Annona crassiflora* (TELLES et al. 2003). Pereira et al. (2004) encontraram 11,89% de variação em *Bowdichia virgiloides* e 6,90% em *Hymenaea stignocarpa*. Para *Dipterix alata* foi relatado 15% de variação genética entre subpopulações (SOARES et al. 2007).

Martins et al. (2006) constataram que populações naturais e antrópicas de *S. lycocarpum* foram fundadas por sementes de múltiplas origens, com grande número de plantas mães contribuindo com descendentes e que, nos cruzamentos, o número de árvores que participam como doadoras de pólen é superior a dez por progênie.

A genética da conservação exerce um importante papel dentro da biologia da conservação, proporcionando um melhor entendimento dos padrões e processos relacionados à população (SOARES, 2006). A dinâmica de alelos em uma população, a história de vida e as características ecológicas de uma determinada espécie permitem conhecer sua biologia, bem como a interação com outras espécies presentes em seu bioma de origem (TELLES et al. 2003).

Populações existentes em grandes áreas preservadas podem ser importantes para a manutenção de pequenas populações, como fonte de pólen e sementes, assim como para a viabilidade das populações de polinizadores e dispersores (COLLEVATTI et al. 2001).

Margens de estradas são um tipo de ambiente que pode ser considerado complementar para a conservação de recursos genéticos, pois essas faixas podem

conectar fragmentos e manter uma boa parte da variabilidade genética das populações originais (CHAVES, 2001). Em *S. lycocarpum*, por exemplo, observou-se que os indivíduos que estão dispostos em faixas contínuas em margens de estradas apresentam variabilidade genética semelhante à observada em populações naturais (MARTINS, 2005) e contribuem para a conexão dos fragmentos, ajudando a reduzir a divergência genética entre populações.

2.4 Marcadores moleculares

2.4.1 Aspectos gerais

No caso de plantas, marcadores moleculares têm sido úteis para estudos genéticos populacionais.

Os primeiros estudos genéticos foram realizados com marcadores morfológicos, e estes contribuíram significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e análises de ligação gênica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os primeiros marcadores moleculares foram os isoenzimáticos, desenvolvidas nos anos 1960. Em seguida, com os avanços na biologia molecular, como a descoberta das enzimas de restrição em 1960 e da reação em cadeia da polimerase, (PCR) em 1980, foi possível introduzir novos marcadores (CIAMPI; GRATTAPAGLIA, 2001) e simplificar consideravelmente os estudos da biologia molecular (CARVALHO; TORRES, 2002). Atualmente, os marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma (CAIXETA et al. 2006).

Os marcadores moleculares correspondem a locos presentes nos cromossomos ou organelas citoplasmáticas, que podem ser expressos (isoenzimas) ou não (DNA genômico), e têm gerado informações valiosas sobre a variabilidade genética de espécies cultivadas e nativas para estudos de populações, taxonomia, conservação de germoplasma (CARVALHO; TORRES, 2002), sistema de cruzamento (CIAMPI; GRATTAPAGLIA, 2001), identificação de indivíduos e de espécies crípticas e a formulação de hipóteses filogenéticas (SOLE-CAVA, 2001).

Os marcadores adequados para análises genéticas devem apresentar locos com dois ou mais alelos; representar grande parte do genoma da espécie em estudo; apresentar reconhecimento fácil dos fenótipos homocigotos e heterocigotos; não depender do estágio de desenvolvimento do indivíduo; não apresentar correlação com o efeito fenotípico de interesse; e não apresentar efeitos epistáticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CARVALHO; TORRES, 2002).

A análise de dados discretos a partir de marcadores, baseada em polimorfismo de DNA, é uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies em curto espaço de tempo (CIAMPI; GRATTAPAGLIA, 2001).

O estudo de genética de populações foi revolucionado a partir da utilização de marcadores moleculares em nível de DNA (SOARES, 2006), pois permitem identificar características do DNA que são herdadas geneticamente e diferenciam dois ou mais indivíduos. Têm sido bastante utilizados em melhoramento vegetal, estudos de conservação e de biologia reprodutiva em populações naturais (GAIOTTO, 2001), além de estudos sobre a estrutura genética de populações.

Tais marcadores permitem a identificação dos efeitos da fragmentação e são úteis em programas de manejo para conservação genética de populações (SCHNEIDER et al. 2003). O estudo de estrutura populacional, por meio de técnicas moleculares, talvez seja a parte mais importante da genética da conservação e tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente, como nas espécies ameaçadas de extinção (SOLE-CAVA, 2001).

2.4.2 Marcadores moleculares microssatélites

Segundo Matioli e Passos-Bueno (2001), a técnica de ultracentrifugação em equilíbrio com cloreto de cério permite que se possam separar moléculas por meio de diferenças em densidade, pois solução desse sal, quando submetida a grandes forças centrífugas, tende a formar um gradiente de densidade e as macromoléculas concentram-se na região que tem a mesma densidade ao longo do gradiente formado. Quando amostras de DNA são analisadas por meio desta técnica, seguem

os autores, é normal que se observem acima e abaixo da maior parte do DNA bandas definidas, “DNA satélites”, que consistem em seqüências repetitivas.

No genoma de eucariontes há uma grande quantidade de seqüências de DNA repetitivas (CARVALHO; TORRES, 2002; CAIXETA et al. 2006), que diferem no número de nucleotídeos e por isso são importantes ferramentas para análise genética, pois possibilitam amostrar um grande número de locos polimórficos distribuídos no genoma (CARVALHO; TORRES, 2002). Os marcadores microssatélites (ou seqüência simples repetitiva, SSR) são seqüências de nucleotídeos repetidos em “tandem” em que a unidade repetitiva varia de um a seis pares de bases (CAIXETA et al. 2006). Representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais a taxas muito maiores do que as observadas nas seqüências de cópia única (CARVALHO; TORRES, 2002). A estratégia para análise deste tipo de marcador é a amplificação do fragmento que contém as repetições, utilizando-se, como *primers*, oligonucleotídeos que hibridam com as regiões que flanqueiam as repetições (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001). *Primers* específicos são obtidos, pois as seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie e, via PCR, os fragmentos contendo o DNA repetitivo são amplificados em todos os genótipos (CAIXETA et al. 2006).

Os marcadores microssatélites apresentam herança mendeliana e, após a amplificação por PCR (“*Polymerase chain reaction*”), os alelos de um loco são identificados por meio de migração relativa em gel de eletroforese. Esses constituem os marcadores ideais para estudo de populações, pois os locos genéticos são altamente variáveis, multialélicos (CAIXETA et al. 2006), apresentando alto conteúdo de informação genética para estudos de diversidade, e têm sido desenvolvidos de forma crescente para espécies arbóreas, em diferentes aplicações (CIAMPI; GRATTAPAGLIA, 2001).

Análises de frequência alélica em marcadores codominantes, como nos locos microssatélites, podem ser utilizadas para estimar parâmetros de estrutura e diversidade genética de populações (SCHNEIDER et al. 2003). Estes marcadores são os mais indicados para estudos com genética de populações (ZUCCHI et al. 2003),

embora ainda não estejam disponíveis para todas as espécies (SCHNEIDER et al. 2003).

Estes tipos de marcadores estão substituindo rapidamente outros marcadores em diversos tipos de estudos genéticos, especialmente devido à sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução, por constituírem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje. Além disso, parecem ter uma distribuição freqüente e aleatória, permitindo uma cobertura ampla do genoma (CAIXETA et al. 2006). Esses autores ainda comentam que alguns marcadores microssatélites desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados com sucesso em outra espécie, conforme observado por Zucchi et al. (2002), que utilizaram *primers* desenvolvidos para *Eucalyptus spp* (BRONDANI et al. 1998) em *Eugenia dysenterica*, e verificaram que a possibilidade de transferência ocorre devido à homologia na seqüência de DNA em regiões que flanqueiam os microssatélites. O mesmo foi feito por Martins et al. (2006) que transferiram para *S. lycocarpum primers* desenvolvidos para *Capsicum spp.* (BUSO et al. 2000). A transferência de marcadores microssatélites para espécies diferentes faz com que eles tenham grande potencial no mapeamento comparativo e na clonagem de genes interespecíficos (CAIXETA et al. 2006).

No entanto, este marcador também apresenta limitações, como a impossibilidade de desenvolver “*primers* universais”, ou seja, na grande maioria é necessário isolar e desenvolver *primers* específicos para cada espécie, o que é um processo demorado, trabalhoso e de alto custo. Porém, essa desvantagem é compensada, pois, uma vez desenvolvidos, estes podem ser utilizados com a facilidade e rapidez da técnica PCR, além da eficiência do uso desses marcadores pela comunidade (CAIXETA et al. 2006).

2.4.3 Marcadores moleculares isoenzimáticos

As proteínas são compostas por um ou mais polipeptídeos, e a seqüência de aminoácidos destes é determinada pela seqüência de nucleotídeos; portanto, pequenas mudanças na seqüência de DNA podem alterar a estrutura de uma

proteína (GRIFFITHS et al. 2006). Enzimas são os produtos primários dos genes; a variação em sua estrutura poderia fornecer informações seguras com relação à variabilidade do genoma (CARVALHO; TORRES, 2002).

As isoenzimas são formas múltiplas de uma mesma enzima codificada por um ou mais locos gênicos (ROBINSON, 1998; CARVALHO; TORRES, 2002; CAIXETA et al. 2006), é um marcador codominante, em que os genótipos individuais podem ser inferidos por meio do padrão de bandas (SOLFERINI; SELIVON, 2001).

Estudos com isoenzimas têm fornecido informações importantes para a Biologia Evolutiva, pois têm permitido, dentre outros, a quantificação de níveis de variabilidade genética, estimativas de fluxo gênico, elucidação de limites interespecíficos e estabelecimentos de relações evolutivas entre táxons (CAIXETA et al. 2006; SOLFERINI; SELIVON, 2001). Análises de isoenzimas podem ser indicadoras de variabilidade genética populacional, pois os resultados são obtidos baseados na frequência gênica, e os locos são considerados uma amostra aleatória do genoma (ROBINSON, 1998). A variabilidade dos padrões enzimáticos de uma população geralmente é atribuída à segregação genética e designada polimorfismo (CARVALHO; TORRES, 2002).

O emprego das isoenzimas como marcadores contribuiu com informações para diversos aspectos da genética vegetal (ROBINSON, 1998), como estudos taxonômicos, filogenéticos, fisiológicos e genéticos (BRUNE; ALFENAS, 1998). O custo relativamente baixo, facilidade de adaptação para qualquer grupo de organismo, e possibilidade de analisar grande número de indivíduos e muitos locos de uma amostra são as vantagens apresentadas por esta técnica (CAIXETA et al. 2006; SOLFERINI; SELIVON, 2001). Não são detectados efeitos deletérios, epistáticos ou pleiotrópicos associados aos alelos isoenzimáticos (CAIXETA et al. 2006).

No entanto, apresenta algumas dificuldades inerentes à metodologia. A técnica se limita às enzimas solúveis, e somente são detectadas as substituições de aminoácidos que resultam em diferenças na mobilidade da proteína durante a eletroforese (ROBINSON, 1998). Os níveis de variabilidade podem estar sendo subestimados, pois mutações no material genético nem sempre levam a alterações na estrutura protéica e nem toda alteração na seqüência de aminoácidos provoca

diferença na mobilidade eletroforética (SOLFERINI; SELIVON, 2001). Algumas outras desvantagens são comentadas por Caixeta et al. (2006), como baixo nível de polimorfismo por loco, influência do ambiente e do estágio de desenvolvimento da planta na expressão de certas enzimas e complexidade de alguns zimogramas, cuja interpretação é dificultada, devido à presença de alelos nulos (ROBINSON, 1998).

2.5 A lobeira

De acordo com Silva Junior (2005), *Solamen* (*Solanum*) significa consolo, alívio, em referência ao efeito de várias espécies do gênero de acalmar a dor e produzir sono; *lyco*= lobo e *carpum*=fruto (*lycocarpum*), fruta de lobo.

O nome *Solanum lycocarpum* tem sido usado para um grupo de espécies muito próximas: *Solanum citrinum*, *S. grandiflorum*, *S. lycocarpum* e *S. aff. lycocarpum* (ALMEIDA et al. 1998). Neste estudo foi utilizado *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Figura 2), pertencente à família Solanaceae, apresentando em média 4m de altura.



Figura 2 – Indivíduo de *Solanum lycocarpum* St. Hil.

Solanum lycocarpum possui comportamento típico de plantas pioneiras em ambientes antropizados e ocupa principalmente áreas degradadas, sendo muito comum a presença em margens de estradas.

As inflorescências produzem de 6 a 13 flores, são agrupadas e do tipo cimeira monocásica helicoidal distribuindo-se por toda copa da planta (OLIVEIRA FILHA; OLIVEIRA, 1988). O pedúnculo da flor é curto, cálice piloso e aculeado que se separa em três segmentos quando a flor se abre. As pétalas das flores são azuis tendendo a violeta, unidas entre si. As anteras formam um cone de cor amarela no centro da flor (Figura 3a), e juntamente com o estigma são dirigidas para cima (OLIVEIRA FILHO; OLIVEIRA, 1988).

Solanum lycocarpum é andromonóica, ou seja, apresenta no mesmo indivíduo flores hermafroditas e flores funcionalmente masculinas (OLIVEIRA-FILHO; OLIVEIRA, 1988). Floresce durante todo o ano, porém com maior intensidade durante a estação chuvosa (OLIVEIRA FILHO; OLIVEIRA, 1988; RODRIGUES, 2002; MOURA, 2004). Martins (2005) verificou que a espécie se reproduz predominantemente por cruzamento, mas análises genéticas indicam a ausência de mecanismos de incompatibilidade. No entanto, Oliveira Filho e Oliveira (1988), em estudos com cruzamento controlado em *S. lycocarpum*, apontam mecanismo de auto-incompatibilidade para esta espécie. As abelhas de grande porte do gênero *Xylocopa* são consideradas os polinizadores mais freqüentes e eficientes (OLIVEIRA-FILHO; OLIVEIRA, 1988).

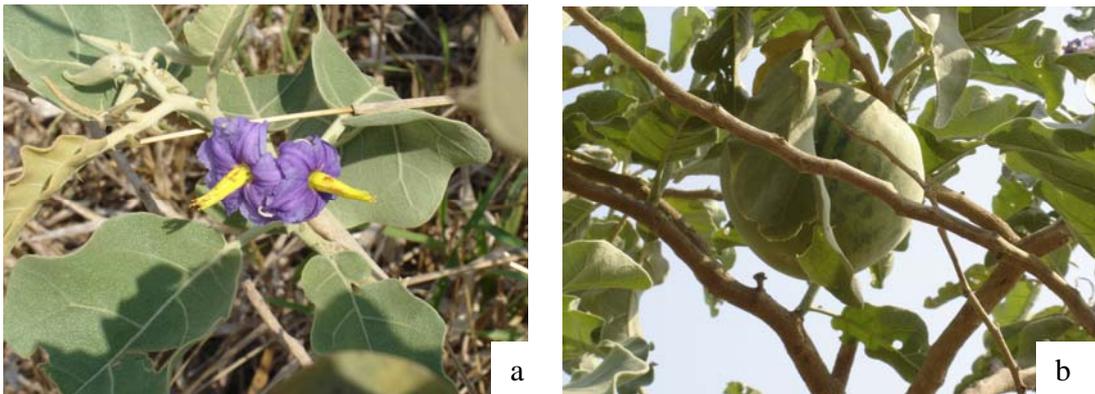


Figura 3 – Flores (a) e frutos (b) de *Solanum lycocarpum*

O fruto é do tipo baga, que permanece verde mesmo quando maduro; o endocarpo é polposo, amarelo e aromático (Figura 3b); Rodrigues (2002) verificou que a velocidade média de maturação dos frutos varia muito ao longo do ano,

relatando uma variação média de 47 a 120 dias. Quando maduros, os frutos caem no chão, facilitando acesso aos dispersores (RODRIGUES, 2002). Produzem numerosas sementes, alta taxa de germinação e rápida emergência (ALMEIDA et al. 1998). As sementes são cinza-escuras, reniformes e achatadas (ALMEIDA et al. 1998). Rodrigues (2002) relata que existe uma relação positiva entre o número de sementes e a massa dos frutos de lobeira. Estudos de germinação de sementes de *S. lycocarpum*, em condições naturais, mostram que a germinabilidade é maior em sementes dispostas em solos de ambientes antrópicos, sugerindo a existência de algum fator físico, químico ou nutricional contribuinte para germinação e estabelecimento de plantas (BORGUETTI; PESSOA, 1997). Durante estágio inicial de desenvolvimento dessa espécie, podem-se observar estruturas tipicamente xeromorfas, que contribuem para o estabelecimento inicial em ambiente natural (Elias et al. 2003). Em condições de baixa disponibilidade de água, *S. lycocarpum* apresentou um maior desenvolvimento no sistema radicular (VIDAL et al. 1999), comprovando a adaptação da espécie em condições de estresse hídrico (CHAVES-FILHO; STACCIARINI-SERAPHIN, 2001).

O fruto da lobeira é freqüentemente consumido pelo lobo guará (*Chrysocyon brachyurus* Illiger), maior canídeo da América do Sul, que ocorre principalmente no Cerrado, e que morcegos podem ser possíveis consumidores do fruto da lobeira (RODRIGUES, 2002). Mas pequenos mamíferos do cerrado também desempenham esta função (COUTERNAY, 1994).

O lobo guará pode percorrer até 40km em uma noite, o que o faz um eficiente promotor de fluxo gênico em longas distâncias. A eficiência do lobo guará como agente de fluxo gênico via sementes em *S. lycocarpum* foi corroborada em um estudo com marcadores moleculares (MARTINS, 2005), que observou a distância média de migração de sementes em cerca de 20,26 km, e distância de dispersão de sementes em até 40 km.

O gado também pode contribuir para a dispersão de sementes, pois há relatos de que estes animais consomem a fruta do lobo, e são conduzidos pelas estradas por vaqueiros; por onde passam podem estar dispersando as sementes.

Nativos da região de ocorrência desta planta utilizam os frutos para fabricação de doces caseiros, xarope contra asma e polvilho contra diabetes. A infusão da raiz é utilizada para combater hepatite (ALMEIDA et al. 1998). Esta planta também é utilizada como forrageira, ornamental, e a casca da planta é utilizada na tinturaria por artesões locais (ALMEIDA et al. 1998).

Santos et al. (2002) comentam que uma espécie de ampla distribuição geográfica, como é o caso da lobeira, poderá originar populações geneticamente distintas, uma vez que ambientes diferentes apresentam diferentes pressões de seleção, fazendo com que um genótipo que proporciona valor adaptativo superior num dado ambiente possua menor adaptação a outro.

Kageyama et al. (2001) comentam sobre a estratégia de selecionar espécies modelos para serem estudadas para fins de conservação, relatando que essas representam grupos de espécies com características ecológicas comuns e que tem padrões genéticos e ecológicos exploráveis, até certo ponto, para todo o grupo. Para Martins (2005) *S. lycocarpum* apresenta características que permite ser considerada modelo para conservação.

Devido à ampla distribuição e facilidade em ocupar ambientes antropizados, surge à necessidade de estudar estrutura genética populacional em *S. lycocarpum* comparando estes dois tipos de ambientes, pois perturbações no ambiente podem promover perda de alelos e, assim sendo, pode estar ocorrendo grande ocupação pela espécie, porém com menor diversidade genética do que quando comparado a ambientes sem grande intervenção humana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Biologia reprodutiva

3.1.1 Área de estudo

Foi selecionada uma população de *S. lycocarpum* situada no município de Morrinhos, sul do estado de Goiás, sob as coordenadas 17° 55' (S); 49° 00' (W), esta população também foi estudada com marcador molecular SSR, será apresentada posteriormente denominada População 3 (Ma). Está situada em uma área de pastagem e ocupa aproximadamente 8800 m², sendo a amostra composta por 34 indivíduos com altura variável entre 1,15 m e 3,03 m. Todos os indivíduos foram georreferenciados com o auxílio de um aparelho GPS (e-trex Garmim ®), obtendo assim um mapa da população (Figura.4 - C).

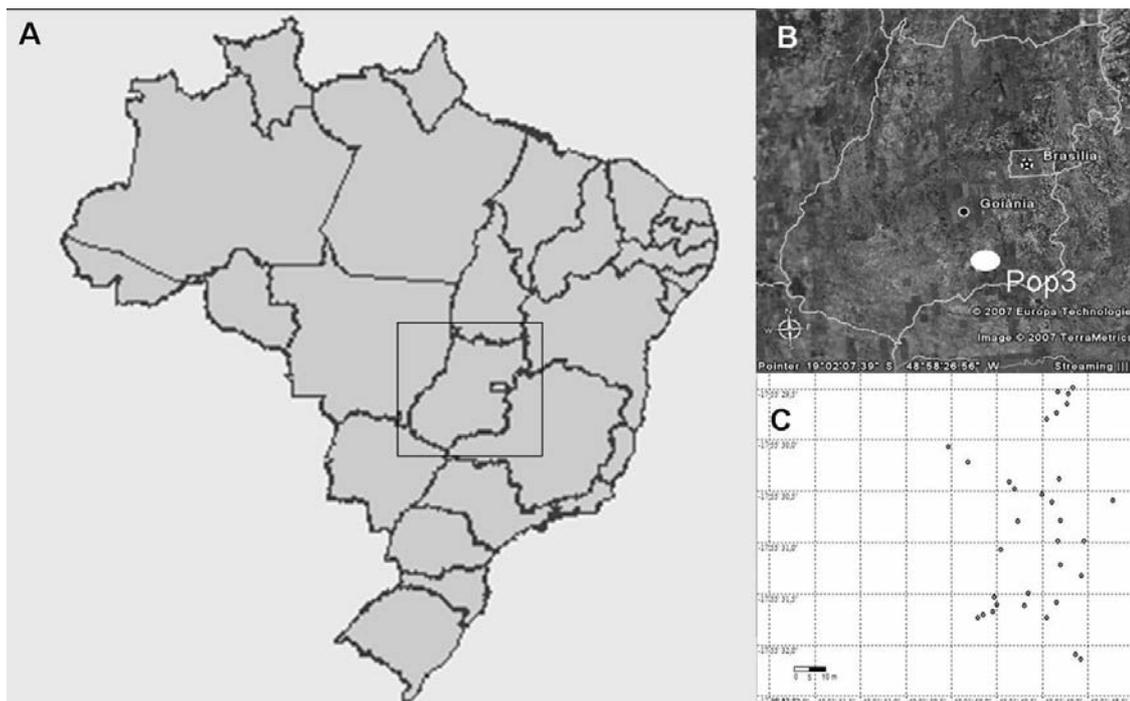


Figura 4 – (A) Mapa do Brasil, indicando os estados brasileiros (IBGE, 2005); (B) Estado de Goiás, apontando a localização da Pop3 (Ma); (C) Distribuição espacial dos indivíduos de *S. lycocarpum* estudados na Pop3 (Ma)

3.1.2 Coleta de dados

Durante um período de 13 meses, de junho de 2005 a junho de 2006, foi feita a quantificação mensal de flores abertas e frutos em cada planta. Os indivíduos muito

próximos foram considerados como apenas um indivíduo, pois se apresentavam em forma de moitas, impossibilitando a distinção entre eles.

Dados de temperatura do ar a 1m do solo (°C), umidade relativa do ar a 2m do solo (%) e precipitação (mm) do município de Morrinhos foram obtidos durante o período de estudo. Os dados meteorológicos foram fornecidos pela Estação de Meteorologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG) – Unidade Universitária Morrinhos, Departamento de Geografia. A população em estudo está situada a uma distância aproximada de 20 km da estação meteorológica.

3.1.3 Análise estatística

Foi estimada a produção total de flores e frutos durante o período em estudo, a percentagem de plantas que se apresentaram no período reprodutivo e o número médio de flores e frutos encontrados.

Para avaliar se floração e frutificação estão relacionadas com as variáveis ambientais, temperatura, umidade e precipitação, foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman (r_s), que é uma estatística não paramétrica, entre cada variável ambiental, e o valor mensal de flores e frutos encontrados na população. Para as variáveis ambientais, foram consideradas a média mensal de temperatura e umidade e a precipitação total de cada mês. Para todas estas análises foi utilizado o pacote estatístico SAS versão 9.0.

Como recomendado por Kageyama (1977), o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) foi utilizado nos dados referentes à variação ambiental, pois esses não seguem distribuição normal. Os coeficientes de correlação de Spearman foram calculados de acordo com a eq.(1):

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{(n-1)(n)(n+1)} \quad (1)$$

Em que:

6 = Constante;

d_i = Diferenças entre as posições para as duas características;

n = Número de valores.

A significância dos valores r_s foi testada pelo teste t, conforme eq. (2):

$$t = \frac{r_s \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r_s^2}} \quad (2)$$

Com n-2 graus de liberdade

Em que:

n = número de dados em cada variável.

(r_s) = correlação de Spearman

3.2 Estrutura genética populacional

3.2.1 Amostragem

O presente estudo, constantemente, refere-se a áreas naturais e antropizadas, portanto, leiam-se populações naturais como populações com menor índice de intervenção humana.

Foram selecionadas quatro populações de *S. lycocarpum* no Estado de Goiás, sendo duas, uma natural e uma antropizada, situadas a Sul do estado (municípios de Morrinhos e Caldas Novas) e as outras duas, também uma natural e outra antropizada, a Nordeste do estado (município de Alto Paraíso) (Figura 5). A seleção de dois pares de populações, formados por natural próxima a antrópica, foi feita para permitir a comparação da diversidade genética, assim como estimar o fluxo gênico aparente a curta e longa distâncias.

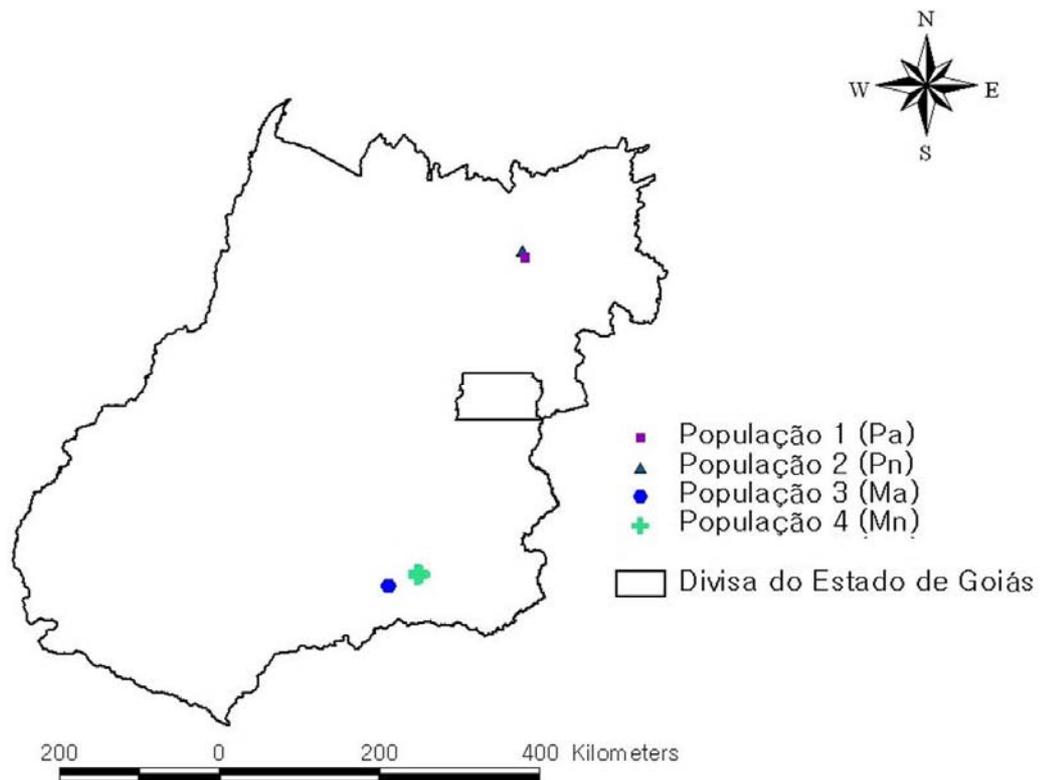


Figura 5 – Localização geográfica das quatro populações de *S. lycocarpum* estudadas com marcador microssatélite no Estado de Goiás

A população 1 (Pa) é constituída por plantas situadas à margem de estradas, com predominância de *Brachiaria* sp. e sob coordenadas 17°46' (S) e 49°01' (W). A população 2 (Pn) está situada em uma área natural no município de Alto Paraíso, constituída por poucas árvores de altura média entre 7 a 8 m, podendo ser considerado entre as fitofisionomias do Cerrado como um campo sujo, situado a 1350 m de altitude, e sob coordenadas 14°07' (S) e 47°31' (W). Esta é a região de maior altitude do estado de Goiás. A distância cartográfica entre população 1 (Pa) e população 2 (Pn) é de 9 km.

A população 3 (Ma) é a mesma utilizada para estudos de biologia reprodutiva e consiste em uma área de pastagem no município de Morrinhos, região Areias (Figura 4). Área com predominância de *Brachiaria* sp., está situada a 627 m de altitude. A população 4 (Mn) é uma população natural de proteção ambiental localizada no

Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, constituindo uma população típica de cerrado sentido restrito, onde há poucas árvores de altura variando entre 7 e 8 m, e uma diversidade de arbustos. Está situada a cerca de 1000 m de altitude, sob coordenadas 17°46' (S) e 48°40' (W). A distância geográfica entre a população 3 (Ma) e a população 4 (Mn) é de 41 km.

A distância entre as duas populações naturais é de 423,83 km; e entre as duas populações antrópicas é de 443,91 km.

A estratégia de coleta consistiu em percorrer a área em estudo, amostrando todos os indivíduos encontrados até que o número amostral de 60 indivíduos fosse atingido. Os indivíduos amostrados foram georreferenciados com uso de um equipamento GPS (e-trex Garmim ®). As amostras foliares coletadas de cada indivíduo foram armazenadas em sílica gel e transportadas ao Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, para realização das análises.

3.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico

O protocolo utilizado para extração do DNA seguiu o procedimento CTAB descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Após a extração, realizou-se a quantificação do DNA das amostras por meio de comparação com amostras de DNA de quantidades previamente conhecidas (DNA do fago λ), após eletroforese em gel de agarose, durante 30min (sob 80V e 40 mA). O DNA, corado com brometo de etídeo, foi visualizado sob luz ultravioleta. Com base na quantificação, foi feita a diluição das amostras a 2,5 ng/ μ l de DNA para análise.

3.2.3 Locos microssatélites

Como ainda não há disponíveis *primers* para *Solanum lycocarpum*, foram utilizados *primers* desenvolvidos para outra espécie de Solanaceae, *Capsicum* spp. (pimenta e pimentão) conforme Buso et al. (2000), e transferidos para a lobeira

conforme realizado por Martins et al. (2006). A seqüência de cada *primer* e a respectiva temperatura de anelamento estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Temperatura de anelamento (T_m), seqüência de cada par de *primers* e motivo da repetição

Loco	T_m	Seqüência de primer (5' – 3')	Motivo*
CA 23	56°C	GGCTCCTAGGTATGCACCAG AATGTGATGCACAGTGCACC	(TC) ₃₁
CA 53	56°C	CGACCTTCAGGACAGATCAT CTGGTAACCTAGAAAGGCAG	(TC) ₂₅
CA 88	54°C	AATGGATGTTCCCTTGCTTT CAACTGATCAACCATTCCGT	(AG) ₂₂
CA 144	54°C	TAGAAACACAAAATGTCCCC CCATTGACAAGGACAATTCT	(GT) ₅ (GA) ₂₁
CA 161	54°C	CAGGTACGTGCTGCTATCAA TTGGTAAGAAGGCCTGGTAA	(GA) ₃₂
CA 158	56°C	CATGCACGTACAACCTGTTT TAGTTCCTTGCTGCAGTAA	(GA) ₂₇

*Motivos observados em *Capsicum* spp.

3.2.4 Reações de amplificação, eletroforese dos fragmentos amplificados e interpretação dos géis

O coquetel (13µl) para realização da PCR foi composto por 3,3 µl de DNA genômico (2,5 ng/µl), 0,34 µl de H₂O MiliQ, 0,30 µl de dNTPs (2,5µM), 0,30 µl de BSA (2,5 µg/ml), 0,30 µl de tampão para PCR 1X (10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, pH 8,3), 0,2 µl de cada *primer* (0,9 µM) e 1U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria). As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100 utilizando o seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica de cada par de *primers* por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e terminando com 72°C por 7 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 5%, em cuba vertical (Hoefler SQ3 sequencer, Amersham Pharmacia

Biotech, São Francisco, CA, EUA) contendo tampão TBE 1X sob 1600V, 40 mA e 60W, por 1h e 15 minutos.

Após a eletroforese, foi realizada a coloração com nitrato de prata, utilizando o protocolo desenvolvido por Creste et al. (2001). A interpretação dos fragmentos amplificados foi realizada visualmente por meio de comparação com marcador de peso molecular padrão (10bp DNA *ladder*, Invitrogen®), de maneira que fragmentos apresentando diferentes pesos moleculares foram considerados como alelos diferentes.

3.2.5 Marcadores isoenzimáticos

As populações utilizadas para estudo com marcadores isoenzimáticos, uma natural e outra antropizada, estão situadas no Sul do Estado de Goiás.

A população antropizada, denominada População 5 (Ma), consiste em uma área de pastagem no Município de Morrinhos, e a estratégia de coleta foi percorrer a área coletando aleatoriamente folhas dos indivíduos, tendo sido coletado material vegetativo de 41 indivíduos dessa população. A população natural é a mesma utilizada para as análises com marcador microssatélite (População 4, Mn), conforme descrita anteriormente; as análises foram realizadas com os 60 indivíduos coletados. A distância entre estas duas populações é de 45km. As populações estão apresentadas na Figura 6.

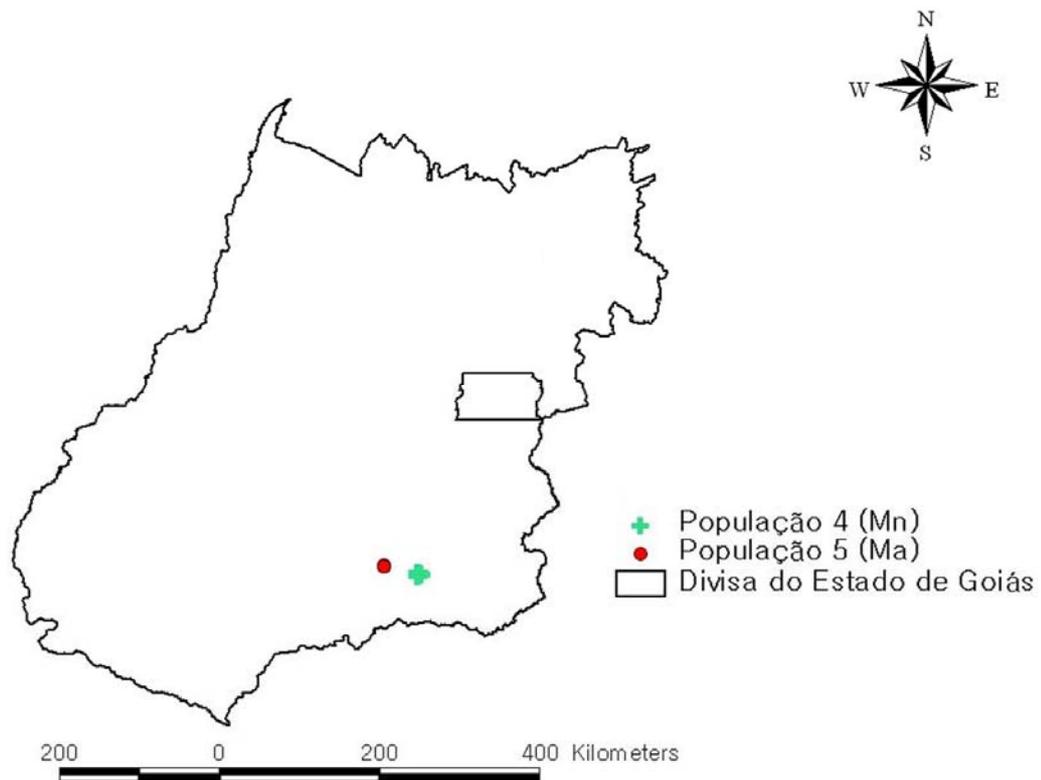


Figura 6 – Localização geográfica das duas populações de *S. lycocarpum* estudadas com marcador isoenzimas no Sul do Estado de Goiás

O procedimento utilizado para obtenção dos géis de isoenzimas é descrito por Guimarães (2006) e Guimarães et al. (2006), que selecionaram 13 locos (α -Est, 6Ppgdh, Mdh, Po, Nadhdh, G6Pdh, Dia, Idh, Pmg, Pgi) para estudo da diversidade genética em *S. lycocarpum*.

No presente estudo, foram utilizados dados de sete locos (IDH, NADHDH, PMG, MR1, MR2, PO1 e PO2). Os demais locos não foram analisados devido a dificuldades em sua interpretação.

3.2.6 Análise estatística

3.2.6.1 Caracterização dos locos e diversidade genética

Todas as análises, que serão descritas neste item, foram utilizadas para os dois tipos de marcadores apresentados neste estudo.

A diversidade genética em cada loco foi caracterizada utilizando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2000), a partir dos seguintes parâmetros: riqueza alélica ou número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o), diversidade gênica (H_e), o índice de fixação de Wright (f) a 95% de significância por 10.000 reamostragens *bootstrap* sobre locos para cada população. O número efetivo de alelos por loco (A_e) foi estimado por meio da eq. (3):

$$\hat{A}_e = \frac{1}{1 - \hat{H}_e} \quad (3)$$

A máxima diversidade possível em cada loco foi estimada a partir do número de alelos observados, segundo a eq.(4):

$$\hat{h}_{\max} = (\hat{A} - 1) / \hat{A} \quad (4)$$

A aderência das freqüências genotípicas às proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada por meio do teste exato de Fisher. As probabilidades exatas menores que o nível de significância ($\alpha=0,05$ ou $0,01$) indicam desvios significativos nas proporções de Hardy-Weinberg.

Foi realizado o teste X^2 para testar a significância do número de alelos encontrado entre as populações estudadas. O grau de liberdade foi calculado G.L.=(L-1)(C-1), conforme Centeno (2002).

3.2.6.2 Estrutura genética

Para os dados obtidos com os marcadores SSR e isoenzimáticos calculou-se a estrutura genética entre as populações, que foi caracterizada pela análise da variância hierárquica das freqüências alélicas com base em Weir (1996). As

estimativas de parâmetros genéticos obtidas foram: $\hat{\theta}_p$ = divergência genética entre populações, \hat{f} = índice de fixação médio dentro de populações, \hat{F} = índice de fixação total para o conjunto das populações. Estas estimativas foram calculadas usando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2000). O intervalo de confiança a 95% dessas estimativas foi obtido por 10.000 reamostragens *bootstrap* sobre locos.

Adicionalmente, a diferenciação genética entre populações foi estimada usando a estatística G_{ST} , segundo método de Hedrick (2005) e usando o programa GDA_NT (Degen, 2006).

O fluxo gênico aparente (\hat{Nm}) entre populações foi estimado de forma indireta conforme a equação apresentada abaixo, segundo o modelo de ilhas proposto por Crow e Aoki (1984), que corrige a análise para pequeno número de populações, eq. (5):

$$\hat{Nm} = \frac{1}{4\alpha} \left(\frac{1}{\hat{F}_{st}} - 1 \right) \quad (5)$$

Em que:

Nm : número de migrantes por geração;

F_{st} : divergência genética entre populações; e

α : correção para o número finito de populações (n), como mostrado na eq.(6):

$$\alpha = [n/(n-1)]^2 \quad (6)$$

Na equação 5 além do índice F_{ST} foi também utilizado o $G_{ST(Hedrick)}$, que é um análogo do F_{ST} adaptado para alelos múltiplos e que pode variar entre 0 e 1 (HEDRICK, 2005). Obtendo assim o fluxo gênico aparente obtido para as estimativas de divergência \hat{F}_{ST} e $\hat{G}_{ST(Hedrick)}$.

Em locos microssatélites, o processo mutacional não está de acordo com o que se admite no modelo de alelos infinitos. Por esse motivo, além da estimativa do

$\hat{\theta}_p$, foi calculada uma análoga a esta, denominada \hat{R}_{ST} (SLATKIN, 1995), desenvolvida especificamente para dados de microssatélite. A estatística R_{ST} , um estimador de R_{ST} , foi estimada para o conjunto de populações e entre pares de populações, usando o programa R_{ST} Calc versão 2.2 (GOODMAN, 1997). A significância da estimativa foi obtida por meio de 1000 permutações e o intervalo de confiança a 95% por 10000 reamostragens *bootstrap*.

O teste de Mantel foi aplicado nos dados SSR para avaliar se há correlação positiva entre a matriz de diferenciação genética (R_{ST}) entre pares de populações e a matriz de distância geográfica entre as mesmas, com uso do programa NTSYS-pc 1.70 (ROHLF, 1992). A comparação das matrizes foi realizada com o intuito de verificar se existe correlação entre diferenciação genética e distância geográfica.

3.2.6.3 Taxa de cruzamento

A Taxa de fecundação cruzada foi estimada, para todas as populações estudadas, conforme o procedimento descrito por Weir (1996) e Vencovsky (1994). Eq(7).

$$\hat{t}_a = \frac{(1 - \hat{f})}{(1 + \hat{f})} \quad (7)$$

3.2.6.4 Padrão espacial da estrutura genética intrapopulacional

A estrutura espacial genética intrapopulacional foi analisada para os locos SSR nas populações 1 (Pa) e 4 (Mn); e para os locos Isoenzimáticos na população 4 (Mn). Nas populações 2 (Pn), 3 (Ma) e 5 (Ma) não foi possível fazer tal estudo, pois os indivíduos localizavam-se muito próximos, não permitindo a separação de classes de distâncias adequadas para a utilização do programa estatístico. A população 4 (Mn) foi a única estudada com os dois marcadores moleculares, e os mesmos indivíduos foram amostrados para os ambos. Por tais motivos, foi analisada a distribuição espacial dos

genótipos somente nas populações 1 (Pa) e 4 (Mn), com locos SSR, comparando-se as áreas natural e antrópica, embora estas estejam situadas em diferentes regiões do estado de Goiás; e na população 4 (Mn) com locos isoenzimáticos, e assim, comparar os resultados obtidos para os dois marcadores.

Para a análise da correlação entre as distâncias espacial e genética entre os indivíduos das referidas populações, foi utilizado o programa estatístico SGS (Spatial Genetic Software) versão 1.0, desenvolvido por Degen et al. (2001). Foi utilizado o número de classes igual a seis (6) para a população 1 (Pa) (Figura 7); e sete (7) para a população 4 (Mn), para os marcadores SSR e isoenzimáticos (Figura 8). O teste foi realizado com 9999 permutações, para fins de obter o intervalo de confiança a 95% de significância. Foi então construído o distograma, gráfico resultante da distância genética encontrada entre os indivíduos. Se não ocorrer estruturação genética, pode-se entender que os indivíduos encontram-se distribuídos aleatoriamente na população.

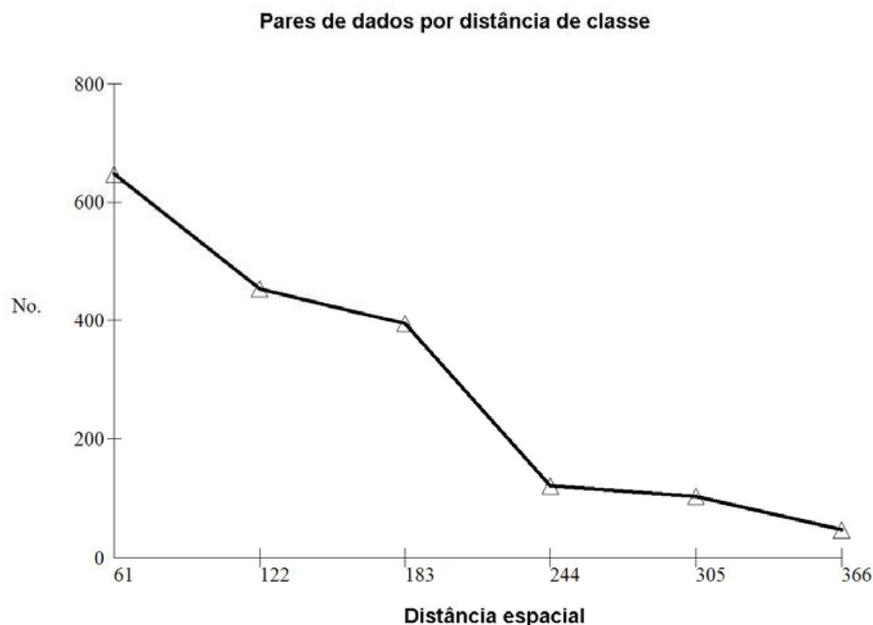


Figura 7 – Número de pares de pontos para cada uma das seis classes de distância geográfica (m) entre 60 plantas de lobeira localizadas na população 1 (Pa) estudadas com os locos SSR. No.= número de pares. Distância espacial apresenta o limite superior das classes de distância

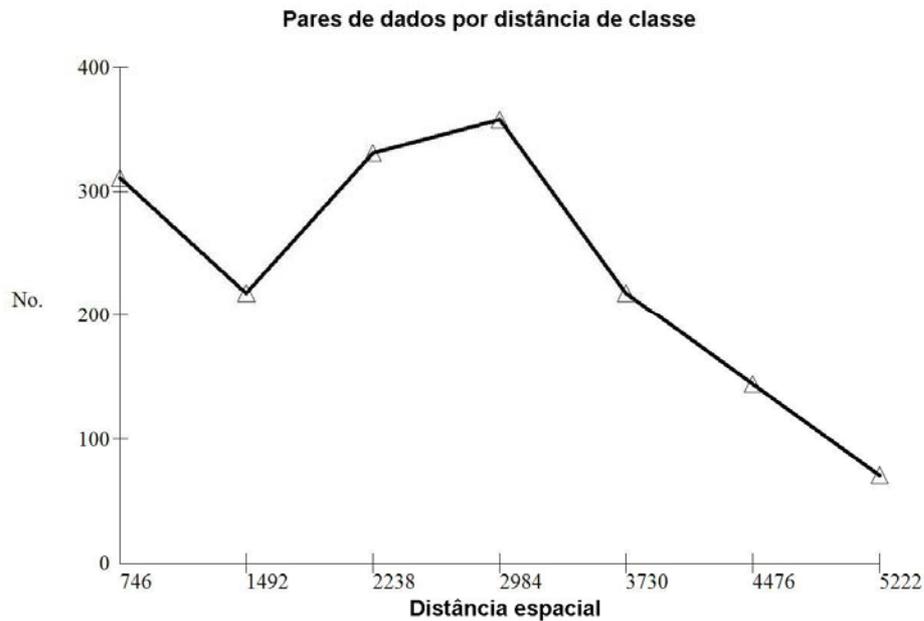


Figura 8 – Número de pares de pontos para cada uma das sete classes de distância geográfica (m) entre 60 plantas de lobeira localizadas na população 4 (Mn) estudadas com os locos SSR e Isoenzimáticos. No.= número de pares. Distância espacial apresenta o limite superior das classes de distância

3.2.6.5 Tamanho efetivo populacional

O Tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e), para cada população, foi calculado com base no valor do coeficiente de endogamia (\hat{f}) estimado para cada população de acordo com a equação apresentada por Vencovsky e Crossa (1999), eq. (8):

$$\hat{N}_e = \frac{n}{1 + \hat{f}} \quad (8)$$

n é o número de indivíduos amostrados.

Se o valor de \hat{f} , como índice de fixação, for negativo deve-se assumir o valor zero para o coeficiente de endogamia, devido ao fato de que os valores que podem ser atribuído a esta estimativa variam entre 0 e 1.

Para estimar o tamanho efetivo de mais de uma população, conjuntamente, será assumido o número de populações como infinito, conforme Martins (2005) que comenta que *S. lycocarpum* é uma espécie que ocupa praticamente toda a extensão da área de estudo, podendo considerar o número de populações na região como infinito.

Para o caso de várias populações, tem-se a eq. (9):

$$N_{e(v)} = \frac{1}{2D_1} \quad (9)$$

D_1 está representado na eq. (10):

$$D_1 = F_{ST} \left[\frac{1+c^2}{S} \left(\frac{S^*}{S^*-1} \right) - \frac{1}{S^*-1} - \frac{1}{n} \right] + \frac{1+F_{IT}}{2n} \quad (10)$$

Em que:

c = coeficiente de variação do número de indivíduos amostrados por populações

$$\left(\frac{s}{\bar{x}} \right);$$

S = número de populações amostradas;

S^* = número real de populações que existe na natureza;

n = número de indivíduos amostrados.

Não é possível estimar o número real de populações que existe na natureza, portanto, para o termo $\left(\frac{S^*}{S^*-1} \right)$ será assumido o valor 1; e para o termo $\left(\frac{1}{S^*-1} \right)$ será assumido o valor 0.

Sendo assim a equação (9) será aproximadamente a eq. 11.

$$\hat{N}_e \cong \frac{S}{2F_{ST}} \quad (11)$$

O número de populações que devem ser conservadas para reter um tamanho efetivo de 500 foi demonstrado por Vencovsky e Crossa (1999). Eq. (12)

$$N_{e(ref)} = \frac{S}{2x\theta_p} \quad (12)$$

Em que:

S = número de populações que devem ser consideradas.

A estimativa $\hat{G}_{ST(Hedrick)}$, apesar de ser análoga ao θ_p , não foi utilizada para estimar o \hat{N}_e , pois as estimativas $\hat{\theta}_p$ e \hat{F}_{ST} são obtidas por meio da variância, e $\hat{G}_{ST(Hedrick)}$ é obtida por meio de heterozigosidade, não sendo, portanto, adequada a para aplicação na equação (10).

4 RESULTADOS

4.1 Biologia reprodutiva

Durante o período estudado, 100% dos indivíduos da população floresceram em pelo menos um mês, e 78,1% das plantas frutificaram em pelo menos um dos meses estudados. Os valores referentes à porcentagem de plantas com flores e frutos e média desses por plantas estão apresentados na Tabela 2. Os números totais de flores, de frutos, precipitação (mm), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (%), obtidos para cada mês, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 - Resultados referentes a valores mensais de porcentagem de plantas com flores e frutos, e média destes na população

Meses	Plantas com flores (%)	Plantas com frutos (%)	Média de flores/planta	Média frutos/planta
Jun/05	58,1	50,0	7,4	5,3
Jul/05	67,6	32,3	6,6	1,8
Ago/05	73,5	11,8	7,6	2,7
Set/05	70,6	41,2	7,8	2,0
Out/05	79,4	35,3	17,1	3,6
Nov/05	79,4	41,2	17,5	5,4
Dez/05	76,5	38,2	12,8	2,2
Jan/06	84,8	23,5	19,0	1,6
Fev/06	84,8	27,3	22,8	1,3
Mar/06	90,6	50,0	28,3	2,6
Abr/06	81,2	62,5	13,1	2,9
Mai/06	87,1	12,5	12,0	1,2
Jun/06	71,0	46,9	11,6	2,3

A maior produção de flores ocorreu no mês de março de 2006, e de frutos em novembro do mesmo ano. No entanto, o mês que apresentou maior porcentagem de plantas com frutos foi abril de 2006.

Ocorreu uma variação significativa na precipitação no decorrer do ano; o período que apresentou valores mais elevados foi de novembro de 2005 a abril de 2006, sendo que a maior precipitação ocorreu no mês de dezembro. A temperatura média apresentou resultados relativamente constantes durante todo o período em estudo. Entretanto, provavelmente ocorreram maiores variações de temperatura se não forem considerados valores médios. Sobre os dados referentes à umidade, embora não

tenham apresentado grandes variações, os valores mais elevados acompanharam a precipitação.

Tabela 3 - Valores encontrados para produção mensal de flores e frutos, e variáveis climáticas: precipitação, temperatura e umidade relativa do ar

Meses	Total de flores	Total de frutos	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)	Umidade relativa(%)
Jun/05	134	---	7,0	21,4	57,1
Jul/05	151	20	0,0	20,1	51,9
Ago/05	189	11	13,0	22,0	41,1
Set/05	187	28	15,0	24,7	45,5
Out/05	462	43	71,8	26,9	43,5
Nov/05	473	76	327,1	24,1	71,2
Dez/05	333	29	480,2	23,8	70,2
Jan/06	533	13	193,8	23,8	65,6
Fev/06	640	12	162,7	24,7	71,9
Mar/06	820	41	328,0	24,5	78,2
Abr/06	340	59	129,4	23,5	72,4
Mai/06	325	5	17,6	19,9	60,6
Jun/06	236	34	0,6	19,1	56,0

Durante todo período de estudo foram registradas 4945 flores abertas e 442 frutos foram produzidos durante este mesmo período. O número de frutos produzidos representa 8,4% do total de flores.

A Figura 7 apresenta a distribuição de flores e frutos durante todo o ano e a Tabela 4 apresenta os valores obtidos para a Correlação de Spearman, relacionando floração e frutificação com as variáveis ambientais.

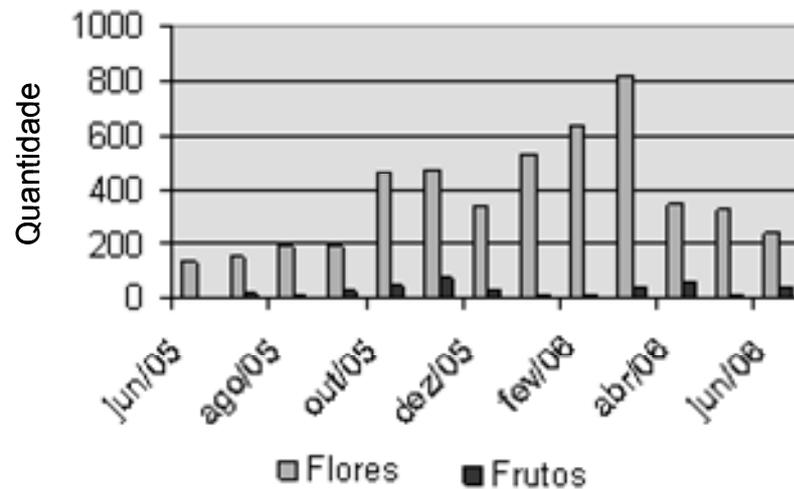


Figura 9 – Quantidade de flores abertas e produção de frutos em *S. lycocarpum* em uma população em Morrinhos, GO, no período de junho de 2005 a junho de 2006

A floração tendeu a apresentar valores ascendentes durante o período de maior precipitação. Apenas no mês de dezembro houve um pequeno decréscimo na produção de flores, que continuou aumentando até o mês de março, quando se iniciou a redução da precipitação e da produção de flores. Houve dois picos de frutificação, um em novembro e outro em abril. O pico de frutificação de abril ocorreu cerca de um mês depois do pico de floração.

Tabela 4 - Resultados referentes a Correlação de Spearman (r_s)

Número total	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
Flores	$r_s = 0,571^*$	$r_s = 0,677^*$	$r_s = 0,808^*$
Frutos	$r_s = 0,396$	$r_s = 0,319$	$r_s = 0,412$

* $P < 0,05$.

Os resultados indicam que houve correlação significativa entre o número de flores e a precipitação (0,808). Para os frutos o valor de t não foi significativo em relação às três variáveis ambientais, sugerindo que não haja correlação entre eles.

4.2 Diversidade genética

4.2.1 Marcadores microssatélites

Para os 240 indivíduos estudados nas quatro populações de *S. lycocarpum*, foram encontrados 30 alelos, com polimorfismo reduzido para a maioria dos locos. Apenas o loco CA158 apresentou número elevado de alelos ($n=20$), como esperado para marcadores microssatélites. O loco CA88 foi excluído das análises de diversidade genética por ser monomórfico. O perfil do Gel para o loco CA158 para a população natural em Caldas Novas/GO (População 4) é representado na Figura 8.



Figura 10 – Perfil dos genótipos microssatélites do loco CA158 na população natural de *S. lycocarpum* em Caldas Novas (Pop4). Gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata

Com exceção do loco CA158, em que foram observados 20 alelos, o número de alelos por loco foi reduzido (Tabela 5). Embora o loco CA158 tenha apresentado o maior número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = 5,26$), esse valor é quase quatro vezes menor que o número de alelos observados. Essa diferença ocorre devido à distribuição desigual das freqüências alélicas. Em outros termos, isto indica que um grande número de alelos neste loco tem baixa freqüência. O loco CA158 foi o que apresentou maiores valores para diversidade gênica ($\hat{H}_e = 0,810$) e proporção de diversidade máxima [$\hat{H}_e / \hat{h}_{\max} = (0,810/0,95) = 0,852$], indicando que a diversidade gênica observada representa 85,2% da máxima diversidade possível para esse loco, caso todos os alelos tivessem exatamente a mesma freqüência ($1/20=0,05$). A diversidade gênica foi reduzida para os locos CA53 e CA161, devido à elevada ocorrência de um determinado alelo.

Tabela 5 - Genética descritiva dos locos microssatélites considerando os indivíduos de todas as populações conjuntamente. n = número de indivíduos amostrados, A = número de alelos, A_e = número efetivo de alelos por loco, H_e = diversidade gênica, h_{\max} = diversidade máxima, H_e / h_{\max} = proporção de diversidade máxima (em%)

LOCO	n	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_e	\hat{h}_{\max}	$\hat{H}_e / \hat{h}_{\max}$
CA23	237	3	2,27	0,555	0,666	83,3%
CA53	238	2	1,01	0,012	0,500	2,4%
CA144	224	3	1,40	0,288	0,666	43,2%
CA158	232	20	5,26	0,810	0,950	85,2%
CA161	236	2	1,00	0,004	0,500	0,8%

4.2.2 Frequências alélicas

Os padrões das frequências alélicas apresentaram uma pequena variação entre as populações, especialmente entre a População 4 (Mn) e as demais, pois ali houve a presença de seis alelos exclusivos e raros (Tabela 6). Pode-se observar que a População 4 (Mn) e o loco CA158 foram os que mais apresentaram alelos privados. Porém, para alguns desses encontrou-se frequência bastante baixa (0,008). Estes ocorreram em apenas um indivíduo heterozigoto da população. Na população 3 (Ma), próxima à população 4 (Mn), foram observados também dois alelos exclusivos. Nas demais não foram observados alelos exclusivos.

Comparando as populações menos antropizadas (Populações 2 (Pn) e 4 (Mn)) com as antropizadas (Populações 1 (Pa) e 3 (Pn)), observa-se claramente que as antropizadas apresentam um menor número de alelos, embora o tamanho amostral tenha sido o mesmo para todas (60 indivíduos).

Tabela 6 - Frequência dos alelos nos cinco locos microssatélites nucleares nas populações estudadas e número de indivíduos amostrados

Loco	Amostra/Alelos (pb)	Populações			
		1 (Pa)	2 (Pn)	3 (Ma)	4 (Mn)
CA23	(n)	60	59	60	58
	98	0,067	0,119	0,092	0,147
	100	0,048	0,298	0,283	0,302
	102	0,525	0,602	0,625	0,552
CA53	(n)	60	60	60	58
	190	-	0,017	-	0,009
	192	1,000	0,983	1,000	0,991
CA144	(n)	60	56	52	56
	86	0,883	0,964	0,779	0,464
	88	0,117	0,036	0,221	0,509
	90	-	-	-	0,027
CA158	(n)	60	56	59	57
	200	-	-	0,025	-
	202	-	-	0,008	-
	206	-	0,018	-	0,114
	208	-	0,009	0,042	0,114
	210	-	0,009	0,220	0,211
	212	0,175	0,152	0,127	0,140
	214	0,092	0,125	0,407	0,044
	216	0,150	0,054	0,034	0,053
	218	0,292	0,330	0,034	0,070
	220	0,238	0,241	0,034	0,070
	222	-	0,027	0,042	0,070
	224	0,008	-	-	0,018
	226	-	-	-	0,026
	228	-	-	-	0,035
	230	-	0,009	0,025	-
	232	-	0,009	-	0,009
234	-	0,009	-	0,009	
236	-	-	-	0,009	
240	-	-	-	0,009	
CA161	(n)	60	60	60	56
	174	-	-	-	0,009
	178	1,000	1,000	1,000	0,991
Total		13	20	18	26
Exclusivos		0	0	2	6

A aplicação de um teste X^2 indicam que há uma variação significativa no número de alelos observados entre as populações naturais e antropizadas (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores encontrados para o teste X^2 , para as populações estudadas com locos SSR

<i>Populações</i>	$X^2_{\text{encontrado}}$	X^2_{tabelado} (95% de significância)
PopNat x PopAnt	6,72*	3,84
Pop1 (Pa) x Pop2 (Pn)	6,93**	3,84
Pop3(Pa) x Pop4 (Pn)	6,03*	3,84
Todas	13,40**	7,81

* P<0,05; ** P<0,01.

PopNat representa o conjunto de populações naturais; PopAnt representa o conjunto de populações antropizadas.

4.2.3 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As probabilidades do teste exato de Fisher mostraram que dos cinco locos microssatélites nucleares utilizados nesse estudo, os locos CA158 e CA23 apresentaram desvios significativos das proporções esperadas pelo modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações. Os demais locos não apresentaram desvios significativos (Tabela 8).

Tabela 8 - Probabilidades exatas (Teste Exato de Fisher) dos desvios das proporções de Hardy-Weinberg em locos microssatélites nucleares nas populações de *S. lycocarpum*

	CA23	CA53	CA144	CA158	CA161
Pop1 (Pa)	0,000**	1,000	1,000	0,000**	1,000
Pop2 (Pn)	0,000**	1,000	1,000	0,000**	1,000
Pop3 (Ma)	0,001*	1,000	0,052	0,000**	1,000
Pop4 (Mn)	0,000**	1,000	0,000**	0,001*	1,000

* P<0,05; **P<0,01.

4.2.4 Diversidade genética intrapopulacional

As populações antrópicas apresentaram número médio de alelos por loco ligeiramente inferiores às populações naturais. O número médio de alelos por locos nas populações 1 (Pa) e 3 (Ma) foi de 2,60 e 3,60, respectivamente, e nas naturais 2 (Pn) e 4 (Mn) foi 4,2 e 5,2, respectivamente (Tabela 9). Entre as populações, a população 4 (natural) foi a que apresentou maior riqueza alélica e maiores níveis de diversidade

gênica ($\hat{H}_e = 0,409$) e heterozigosidade observada ($\hat{H}_o = 0,480$). Não se observaram diferenças significativas de diversidade genética entre as regiões. Entretanto, avaliando-se cada região separadamente, a diversidade genética foi sensivelmente maior nas populações naturais em comparação às antrópicas. O valor médio entre populações de heterozigosidade observada ($\hat{H}_o = 0,346$) foi maior que a diversidade gênica ($\hat{H}_e = 0,334$), indicando a presença de mais heterozigotos nas populações estudadas do que esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. O índice de fixação não diferiu de zero em todas as populações estudadas, indicando ausência de endogamia.

Tabela 9 - Estimativa de diversidade genética para as quatro populações estudadas. n = número de indivíduos; A = número de alelos por loco; H_e = diversidade gênica; H_o = heterozigosidade observada; f = índice de fixação

Amostra	n	\hat{A}	\hat{H}_e	\hat{H}_o	\hat{f} (IC _{95%})*
Alto Paraíso					
Pop1 (Pa)	60	2,60 (2,07)	0,309 (0,347)	0,286 (0,337)	0,072 (-0,469 a 0,510)
Pop2 (Pn)	60	4,20 (4,97)	0,289 (0,361)	0,259 (0,316)	0,106 (-0,390 a 0,464)
Sul de Goiás					
Pop3 (Ma)	60	3,60 (4,22)	0,328 (0,334)	0,357 (0,341)	-0,090 (-0,275 a 0,051)
Pop4 (Mn)	60	5,20 (6,06)	0,409 (0,384)	0,480 (0,423)	-0,175 (-0,513 a 0,098)
Média	60	3,90 (4,30)	0,334 (0,350)	0,346 (0,332)	-0,035 (-0,339 a 0,274)

() desvio padrão; *(IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade, usando 10000 reamostragens *bootstrap* sobre locos.

4.2.5 Estrutura genética e fluxo gênico

Os resultados das estatísticas F sugerem ausência de endogamia nas populações (Tabela 10). O índice de fixação para a média das populações foi negativo e não estatisticamente diferente de zero, de acordo com o intervalo de confiança a 95% de probabilidade. O maior índice de fixação para o conjunto das populações foi obtido para o loco CA144 ($\hat{F} = 0,239$), porém o valor médio entre locos para este parâmetro ($\hat{F} = 0,064$) não difere estatisticamente de zero, sugerindo ausência de endogamia. Por

outro lado, as medidas de diferenciação genética entre populações indicaram diferenças genéticas significativas nas frequências alélicas entre populações. Como esperado, a medida de diferenciação genética entre populações de Hedrick ($G_{ST(Hedrick)} = 0,167$), que considera, além das frequências alélicas, os diferentes tipos de alelos existentes nas populações, apresentou o maior valor de diferenciação genética entre populações, seguida da medida de Weir e Cockerham (1984) e da estatística RHO ($G_{ST(Hedrick)} > \theta_p > R_{ST}$).

Tabela 10 – Estatísticas F (método Weir & Cockerham, 1984) para quatro populações de *S. lycocarpum*. f = índice de fixação; F é o índice de fixação total para o conjunto das populações; θ_p é a divergência genética entre as populações; R_{ST} = divergência entre as populações; $G_{ST(Hedrick)}$ é a divergência genética média entre as populações baseado no método de Hedrick (2005)

Loco	\hat{f}	\hat{F}	$\hat{\theta}_p$	R_{ST}	$\hat{G}_{ST(Hedrick)}$
CA23	-0,333	0,007	-0,324	-0,002	0,025
CA53	-0,005	0,001	-0,003	0,001	0,008
CA144	-0,345	0,239	-0,023	0,255	0,295
CA158	0,277	0,091	0,343	0,129	0,501
CA161	-0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
Média	-0,035	0,064	0,095	0,076	0,167
(I.C.) ¹	(-0,338 a 0,274)	(-0,319 a 0,340)	(0,007 a 0,233)	(0,061 a 0,103)	(0,014 a 0,035)
Nm			1,34	3,00	0,70
(I.C.)*			(0,36 a 0,17)	(0,27 a 3,62)	

¹ Intervalo de confiança a 99% obtido por 10000 reamostragens *bootstrap* sobre locos.

* a 95% utilizando 10000 *bootstraps*.

** $P < 0,001$. Estimado a partir de 10000 permutações entre populações.

A estimativa do fluxo gênico histórico mostrou quadros diferentes em função dos diferentes métodos de estimação da diferenciação genética entre populações. Enquanto as estatísticas θ_p e R_{ST} indicam alto fluxo gênico histórico, a estatística $G_{ST(Hedrick)}$ indica baixo fluxo gênico entre populações, em concordância aos alelos exclusivos observados.

4.2.6 Distância genética e isolamento pela distância

Os dados da Tabela 11 indicam maior proximidade genética entre as populações geograficamente mais próximas. Na região de Alto Paraíso, a divergência genética entre as populações 1 (Pa) e 2 (Pn) ($R_{ST} = 0,004$) foi nula, e ocorreu elevado fluxo gênico entre estas duas populações. A divergência entre as demais foi significativa, e o fluxo gênico foi significativamente inferior quando comparado entre as populações 1(Pa) e 2 (Pn).

Tabela 11 - Distância genética (θ_p , R_{ST} e $G_{ST(Hedrick)}$) e fluxo gênico (Nm) entre pares de populações. Entre parênteses há o intervalo de confiança a 95% por meio de 10000 reamostragens "bootstrap" sobre locos

Populações	θ_p	R_{ST}	$G_{ST(Hedrick)}$
Pop1/Pop2 (Pa/Pn)	0,008 (-0,002 a 0,035) $Nm = 7,68$	0,004 (-0,002 a 0,207) $Nm = 15,43$	0,023 $Nm = 2,633$
Pop1/Pop3 (Pa/Ma)	0,091* (0,018 a 0,153) $Nm = 0,619$	0,062* (0,032 a 0,100) $Nm = 0,93$	0,166 $Nm = 0,311$
Pop1/Pop4 (Pa/Mn)	0,123* (0,010 a 0,303) $Nm = 0,442$	0,086* (0,066 a 0,287) $Nm = 0,65$	0,200 $Nm = 0,248$
Pop2/Pop3 (Pn/Ma)	0,089 (-0,004 a 0,135) $Nm = 0,634$	0,077* (0,049 a 0,283) $Nm = 0,74$	0,147 $Nm = 0,359$
Pop2/Pop4 (Pn/Mn)	0,150 (-0,002 a 0,424) $Nm = 0,351$	0,111* (0,091 a 0,479) $Nm = 0,49$	0,217 $Nm = 0,223$
Pop3/Pop4 (Ma/Mn)	0,080* (0,001 a 0,164) $Nm = 0,713$	0,039* (0,024 a 0,235) $Nm = 1,52$	0,147 $Nm = 0,359$

Apesar da maior semelhança genética entre as populações mais próximas, a correlação entre matrizes geográfica e genética, apesar de alta, não foi significativamente diferente de zero ($r= 0,850$ com probabilidade de 16%).

4.3 Marcadores isoenzimáticos

4.3.1 Caracterização dos locos

Para os 101 indivíduos estudados nas duas populações de *S. lycocarpum*, foram encontrados 15 alelos para os sete locos analisados. O loco Idh apresentou-se monomórfico nas duas populações. Entretanto, os resultados obtidos com este marcador devem ser tomados com cautela, pois o número amostral foi diferente nas duas populações, 60 indivíduos na População 4 (Mn) e 41 indivíduos na População 5 (Ma).

Os locos Nadhdh e Mr1 foram os que apresentaram maior número de alelos por loco ($\hat{A}=3$), mas o loco Mr2 foi o que apresentou maior número de alelos efetivos por loco ($\hat{A}_e=2$), devido à alta frequência dos dois alelos observados nesse loco (Tabela 12). Ali foi encontrada proporção de diversidade gênica máxima ($\hat{H}_e / \hat{h}_{\max} = 100\%$). A heterozigosidade observada foi maior que a esperada em dois locos, Mr2 ($\hat{H}_o=0,813$; $\hat{H}_e=0,500$) e Po1 ($\hat{H}_o=0,382$; $\hat{H}_e=0,342$), indicando maior número de heterozigotos que o esperado pela proporção do Equilíbrio Hardy-Weinberg. Em outros termos, pode estar sugerindo seleção a favor de heterozigotos, porém os valores observados no loco Po1 são próximos e provavelmente não diferem estatisticamente.

Tabela 12 - Genética descritiva dos locos isoenzimáticos. n = número de indivíduos amostrados; A = número de alelos por locos; A_e = número de alelos efetivos por locos; H_e = diversidade gênica; H_o = heterozigidade observada; h_{\max} = diversidade máxima; H_e / h_{\max} = proporção de diversidade máxima (em%).

LOCO	n	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_e	\hat{H}_o	\hat{h}_{\max}	$\hat{H}_e / \hat{h}_{\max}$
Idh	84	1	1,000	0,000	0,000	0,000	0,0%
Nadhhdh	68	3	1,336	0,252	0,073	0,666	37,8%
Pgm	94	2	1,048	0,046	0,000	0,500	9,2%
Mr1	93	3	1,418	0,295	0,013	0,666	44,2%
Mr2	75	2	2,000	0,500	0,813	0,500	100%
Po1	91	2	1,519	0,342	0,382	0,500	68,4%
Po2	43	2	1,824	0,452	0,130	0,500	90,4%

4.3.2 Frequências alélicas

Podem-se observar poucos alelos exclusivos nas populações (Tabela 13), sendo um na população 4 (Mn) e dois na população 5 (Ma). Porém, conclusões referentes a alelos exclusivos devem ser tomadas com cautela, pois a não observação do alelo não implica sua ausência, pode ser apenas que o alelo não foi amostrado. No entanto, a presença destes alelos “exclusivos” sugere ausência e/ou restrição de fluxo gênico entre estas duas populações. Outro fator que contribui para esta hipótese é a maior frequência do alelo 1 no loco Po2 na população 4 (Mn), diferente da população 5 (Ma), onde o alelo 2 tem maior frequência. Diferenças contrastantes nas frequências alélicas entre as populações também são observadas no loco Nadhdh, Mr1 e Po1.

Tabela 13 - Frequência dos alelos nos sete locos isoenzimáticos nas duas populações estudadas; n = número de indivíduos amostrados

Loco	Amostra/Alelos	Populações	
		4 (Mn)	5 (Ma)
Idh	n	48	36
	1	1,000	1,000
Nadhdh	n	41	27
	1	0,707	0,963
	2	0,268	0,037
	3	0,024	-
Pgm	n	53	41
	1	1,000	0,951
	2	-	0,049
Mr1	n	55	38
	1	0,873	0,776
	2	0,127	0,184
	3	-	0,039
Mr2	n	38	37
	1	0,461	0,432
	2	0,539	0,568
Po1	n	53	38
	1	0,377	0,118
	2	0,623	0,882
Po2	n	27	16
	1	0,741	0,469
	2	0,259	0,531
Total		13	14
Exclusivos		1	2

O teste X^2 realizado para verificar se existem diferenças no número de alelos entre estas duas populações não apresentou variação significativa, $X^2_{encontrado} = 0,37$ ($X^2_{tabelado} = 3,84$, com um grau de liberdade).

4.3.3 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As probabilidades do teste exato de Fisher mostraram que dos sete locos isoenzimáticos utilizados neste estudo, os locos Nadhdh, Mr1, Mr2 e Po2, apresentaram desvios significativos das proporções esperadas pelo modelo de Hardy-Weinberg nas duas populações: o loco PGM apresentou desvio somente na Pop5. (Tabela 14)

Tabela 14 - Probabilidades exatas (Teste Exato de Fisher) dos desvios das proporções de Hardy-Weinberg em locos isoenzimáticos em duas populações de *S. lycocarpum*

População	Idh	Nadhdh	Pgm	Mr1	Mr2	Po1	Po2
Pop4	1,000	0,000**	1,000	0,000**	0,000**	0,557	0,000**
Pop5	1,000	0,016*	0,000**	0,000**	0,000**	1,000	0,015*

*P<0,05;**P<0,01.

4.3.4 Diversidade genética intrapopulacional

A população antrópica apresentou número médio de alelo por loco ligeiramente superior à natural. No entanto, a população natural apresentou valores de heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\hat{H}_e=0,289$) e heterozigosidade observada ($\hat{H}_o=0,223$) ligeiramente superiores aos encontrados na área antrópica (Tabela 15). Contudo, o índice de fixação (f) não foi significativo para nenhuma das populações, indicando ausência de endogamia para ambas.

Tabela 15 - Estimativa de diversidade genética para as duas populações estudadas com locos isoenzimáticos. n = número médio de indivíduos; A = número médio de alelos por loco; H_e = diversidade gênica; H_o = heterozigosidade observada; f = índice de fixação

População	n	\hat{A}	\hat{H}_e	\hat{H}_o	\hat{f} (*I.C.95%)*
Pop4 (Mn)	45	1,86 (0,69)	0,289 (0,216)	0,223 (0,321)	0,279 (-0,177 a 0,716)
Pop5 (Ma)	33	2,00 (0,58)	0,250 (0,209)	0,180 (0,294)	0,141 (-0,404 a 0,729)
Média	39,1	1,93 (0,53)	0,270 (0,189)	0,201 (0,301)	0,284 (-0,171 a 0,712)

() desvio padrão; * (I.C.) intervalo de confiança a 95% de probabilidade, usando 10000 reamostragens *bootstrap* sobre locos.

4.3.5 Estrutura genética

Os resultados das estatísticas F indicaram ausência de endogamia nas populações (Tabela 16). Por outro lado, as medidas de diferenciação genética entre

populações foram relativamente altas e significativamente diferentes de zero (Por exemplo: $\hat{\theta}_p = 0,081$; IC= 0,034 a 0,124), indicando 91,9% de divergência genética dentro das duas populações estudadas. Já a estatística $G_{ST(Hedrick)}$ apresentou valor mais elevado, que o valor obtido para θ_p , conforme o esperado.

Tabela 16 - Estatísticas F (Método Weir & Cockerham, 1984) para duas populações de *S. lycocarpum* estudadas com locos isoenzimáticos. f = índice de fixação médio; F = índice de fixação total para o conjunto das populações; θ_p = divergência genética entre as populações. $G_{ST(Hedrick)}$ é a divergência genética média entre as duas populações baseado no método de Hedrick (2005)

Loco	\hat{f}	\hat{F}	$\hat{\theta}_p$	$\hat{G}_{ST(Hedrick)}$
Idh	-	-	-	--
Nadhdh	0,699	0,744	0,150	0,178
Pgm	1,000	1,000	0,034	0,027
Mr1	0,962	0,962	0,002	0,022
Mr2	-0,638	-0,644	-0,003	0,002
Po1	-0,115	0,049	0,148	0,182
Po2	0,738	0,767	0,109	0,199
Média	0,284	0,342	0,081	0,102*
(I.C.) ¹	(-0,171 a 0,712)	(-0,109 a 0,734)	(0,034 a 0,124)	(0,004 a 0,060)
Nm	--	--	0,71 (0.39 a 3.84)	0,55

¹ intervalo de confiança a 95% obtido por 10000 reamostragens *bootstrap* sobre locos.

4.4 Taxa de cruzamento

A Tabela (17) apresenta os resultados obtidos para taxa de cruzamento aparente para cada população estudada e os valores médios, para os dois marcadores moleculares estudados neste trabalho. Os locos SSR apresentaram alta taxa de cruzamento, especialmente nas populações 3 (Mn) e 4 (Ma) que indicam completa ausência de auto-fecundação nas duas populações. O valor médio obtido para este marcador foi 0,918, indicando que a espécie é predominantemente de cruzamento, com apenas 8% de taxa de auto-fecundação.

A taxa de cruzamento aparente encontrada em locos Isoenzimáticos também sugere que a lobeira é de cruzamento misto, predominantemente alógama, porém com

taxa de auto-fecundação consideravelmente superiores a obtida com marcador SSR. 41% de auto-fecundação encontrada nas duas populações.

Tabela 17 – Taxa de cruzamento aparente nas populações de *S. lycocarpum* estudadas com marcadores microssatélites e isoenzimáticos. f = índice de fixação; t_a = taxa de cruzamento aparente

Marcadores	Populações	\hat{f} *	\hat{t}_a
SSR	Pop1 (Pa)	0,072	0,865
	Pop2 (Pn)	0,106	0,808
	Pop3 (Ma)	-0,090	1,000
	Pop4 (Mn)	-0,175	1,000
	Média	--	0,918
Isoenzimáticos	Pop4 (Mn)	0,229	0,627
	Pop5 (Ma)	0,283	0,558
	Média	--	0,592

* o f foi considerado igual a 0 quando este assumiu valores negativos. Para realizar esta estimativa, assumiu-se que as populações estavam em equilíbrio de endogamia, ou seja o coeficiente de endogamia não mudava entre as gerações.

4.5 Padrão espacial da estrutura genética intrapopulacional

A população 1 (Pa) estudada com marcador SSR (Figura 11), indica que indivíduos de *S. lycocarpum* situados a uma distância inferior a aproximadamente 60 m são mais similares entre si, provavelmente parentes. O mesmo pode ser observado nas Figuras 12 e 13, que sugerem que o fluxo de sementes está ocorrendo próximo à planta matriz, ou seja, as sementes aparentemente estão sendo dispersas na vizinhança da mãe. Em outras palavras, existem indivíduos parentes localizados próximo na população. As plantas situadas distantes, não são aparentadas, conforme aumento na distância genética, que é representada pelos picos nos gráficos.

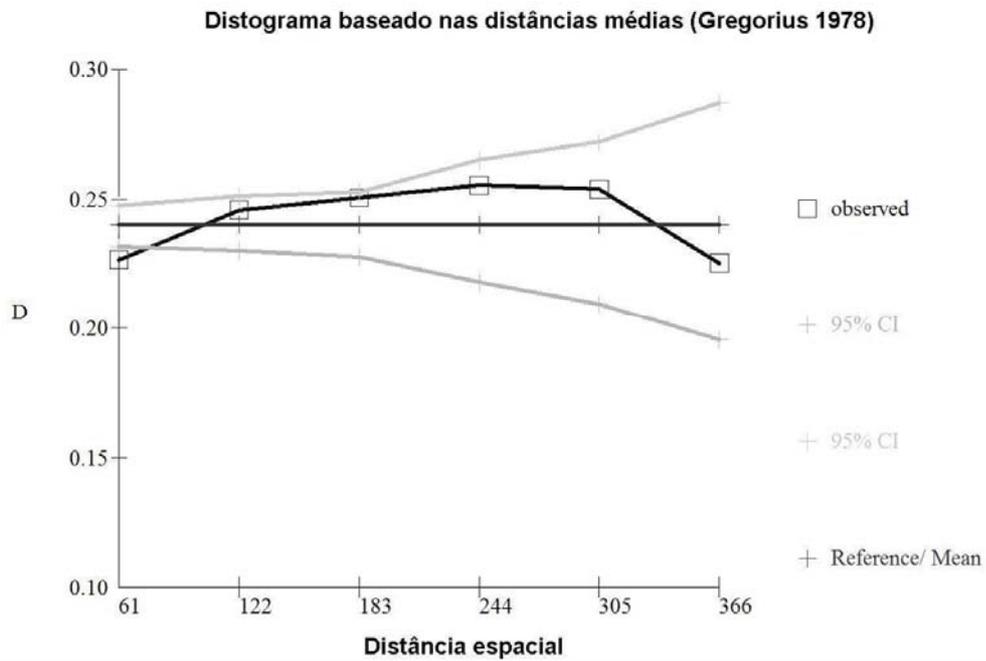


Figura11 – Distograma construído para a população 1 (Pa), a partir das distâncias genéticas médias entre 60 plantas de lobeira distribuídas em seis classes de distância geográfica, estudadas com locos SSR. D= Distância genética

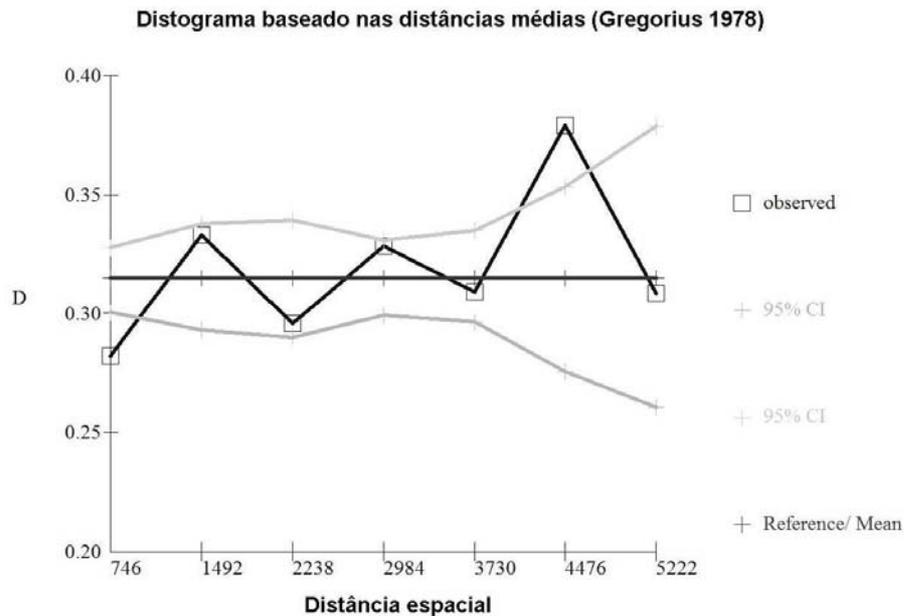


Figura 12 – Distograma construído para a população 4 (Mn), a partir das distâncias genéticas médias entre 60 plantas de lobeira distribuídas em sete classes de distância geográfica, estudadas com locos SSR. D= Distância genética

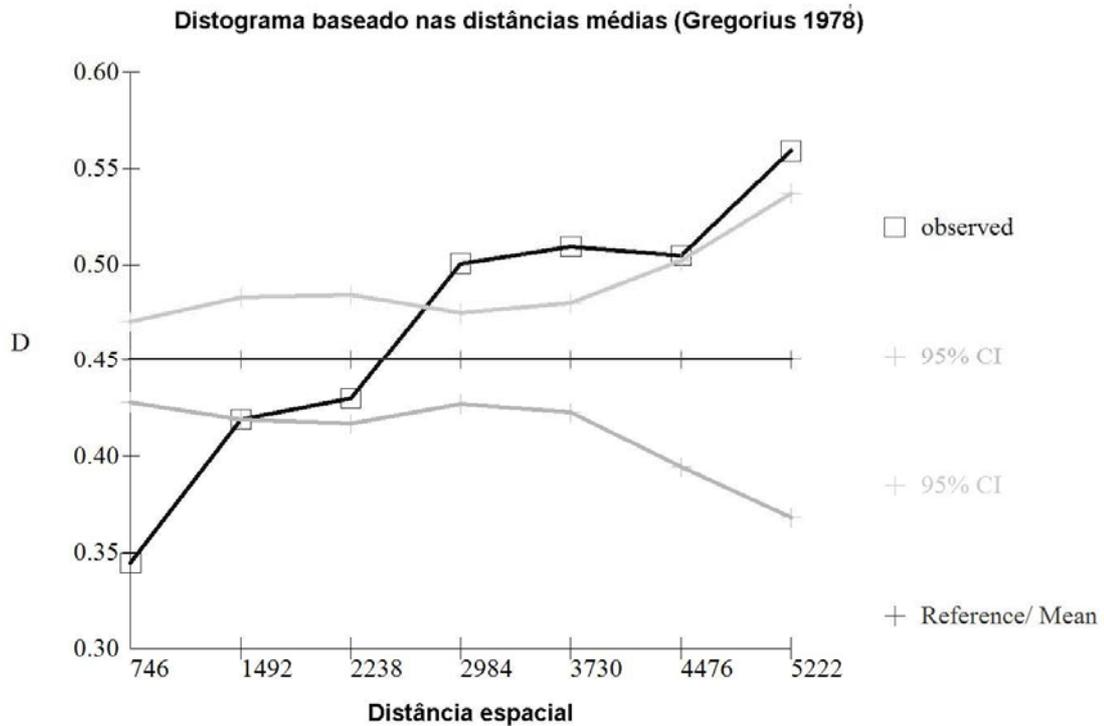


Figura 13 - Distograma construído para a população 4 (Mn), a partir das distâncias genéticas médias entre 60 plantas de lobeira distribuídas em sete classes de distância geográfica, estudadas com locos Isoenzimáticos. D= Distância genética

4.6 Tamanho efetivo populacional

Não houve grande variação do tamanho efetivo (N_e) das populações estudadas com marcador SSR e o tamanho da amostra (Tabela 17). Em outras palavras, o N_e da amostra é aproximadamente o tamanho físico da mesma. Para os locos isoenzimáticos o tamanho efetivo foi reduzido, quando comparado aos locos SSR. O N_e foi estimado para a amostra, neste caso, é importante enfatizar que os valores obtidos são uma representatividade da amostra, e não o N_e da população.

Tabela 18 – Tamanho efetivo populacional calculado para cada população, baseado nas amostras coletadas. n = número de indivíduos amostrados; f = coeficiente de endogamia; N_e = tamanho efetivo calculado

Marcador	Populações	n	\hat{f}	\hat{N}_e
SSR	Pop1 (Pa)	60	0,072	56,0
	Pop2 (Pn)	60	0,106	54,2
	Pop3 (Ma)	60	-0,090	60,0
	Pop4 (Mn)	60	-0,175	60,0
Isoenzimas	Pop4 (Mn)	60	0,229	48,8
	Pop5 (Ma)	41	0,283	31,9

A Tabela 18 apresenta valores do tamanho efetivo obtidos para conjunto de populações ($N_{e(V)}$), e o número de populações que devem ser conservadas para reter um tamanho efetivo de 500 ($N_{e(ref)}$), utilizando a estimativa $\hat{\theta}_p$. Os resultados apontam que o tamanho da população para reter o tamanho efetivo de 500 indivíduos é de 95 e 81 populações, considerando os marcadores SSR e isoenzimáticos, respectivamente.

Tabela 19 – Estimativas populacionais de conservação *in situ*: $N_{e(V)}$ obtido para o conjunto de populações; S é o número de populações que devem ser conservadas para obter um tamanho efetivo de 500 conforme $N_{e(ref)}$

Marcadores	n	$\hat{\theta}_p$	$\hat{N}_{e(V)}$	$\hat{S}_{(ref)}$
SSR	240	0,095	20,00	95
Isoenzimas	101	0,081	11,11	81

5 DISCUSSÕES

5.1 Biologia reprodutiva

Solanum lycocarpum floresceu durante todo o período de estudo, podendo ser observado elevado número de flores por planta. Todas as plantas da população floresceram em pelo menos um mês deste período, obtendo uma variação de 58,06% a 90,62% de plantas floridas. Este resultado confere com o de Moura (2004) que observou uma proporção de 75% de plantas floridas para essa espécie. A média de flores abertas por planta variou de 6,6 a 28,3%, valores superiores ao encontrado por Moura (2004), que observou uma variação de 4,47 a 8,23%. Essa diferença pode estar relacionada ao período estudado, pois as maiores médias deste estudo foram obtidas no período de outubro de 2005 a março de 2006, e o estudo realizado por Moura (2004) compreendeu no período de julho a novembro de 2004, período em que foram observadas menores médias para o presente estudo.

A espécie floresceu durante todo o ano especialmente nos meses de janeiro a março, o que confere com Oliveira Filho e Oliveira (1988) e Almeida et al. (1998) que comenta que a lobeira floresce o ano todo. No entanto, esses autores observam que a floração ocorre principalmente nos meses de março a novembro. A correlação obtida entre flores e precipitação ($r_s = 0,807$) sugere que a produção de flores está associada a essa variável ambiental. Também foi observada correlação positiva entre floração e umidade ($r_s = 0,675$), corroborando com o descrito acima, pois a umidade está diretamente relacionada à precipitação. Fracasso e Sazima (2004) comentam que o pico longo de floração favorece a visitação contínua às plantas, pois a atração exercida sobre as abelhas depende do sinal floral, como odores, coloração e abundância de flores e de plantas. Piedade-Kill e Ranga (2000) constataram que, em *Jacquemontia multiflora* (Convolvulaceae), brotamento e floração ocorrem principalmente ao longo da estação chuvosa, sugerindo que a precipitação é o principal estímulo à produção de folhas e flores. Fato semelhante pode ser observado em lobeira do cerrado, pois a correlação existente entre floração e precipitação permite as mesmas conclusões dos autores citados. Em estudos realizados com *Ruellia brevifolia* (Acanthaceae), Sigrist e Sazima (2002) observaram que fatores ambientais influenciam ciclos cleistogâmicos nessa espécie.

Um importante aspecto a ser considerado é a iniciação floral, mas não foi verificado isto no presente estudo. A iniciação floral é o surgimento da gema floral, que geralmente está associada ao período chuvoso. Provavelmente, na lobeira a floração se dá logo após a iniciação floral, devido à correlação encontrada entre floração e precipitação.

A presença constante de flores na população pode atuar como atrativo para polinizadores, Piedade-Kill e Ranga (2000) comentam que a presença de muitas inflorescências por indivíduos aumenta a atratividade de polinizadores. Oliveira Filho & Oliveira (1988) revelam abelhas do gênero *Xylocopa* como os principais polinizadores de *S. lycocarpum*.

Estudos para verificar a proporção de flores masculinas e hermafroditas foram realizados por Suffert et al. (2006) observando 1,5% de flores hermafroditas; no entanto, Moura (2004) e Moura et al. (2006) registraram 5% de flores hermafroditas nesta espécie. A maior proporção de flores masculinas pode estar favorecendo a polinização cruzada, pois se em um indivíduo houver a presença somente de flores do sexo masculino, não haverá possibilidade de autofecundação, e os grãos de pólen deste indivíduo serão obrigatoriamente conduzidos até outro. Isto pode ser considerado como promotor e/ou ampliar de variabilidade genética. Porém, para plantas do Cerrado isso deve ser tratado com cautela, pois, devido ao grande número de plantas provenientes de brotamento de raízes, o que aparenta serem indivíduos distintos pode ser somente um indivíduo. Estudos moleculares desenvolvidos por Martins et al. (2006) não apresentaram evidências de auto-incompatibilidade em *S. lycocarpum*; no entanto, estudos experimentais realizados por Oliveira Filho e Oliveira (1988) apresentam que pode ocorrer auto-incompatibilidade nesta espécie.

Nesse estudo, a produção de frutos corresponde a 8,4% do total de flores, sugerindo alta conversão de flores hermafroditas em frutos. Suffert (2006) comenta que a fertilidade das flores hermafroditas parece compensar o número reduzido de flores. Oliveira Filho e Oliveira (1988) observaram flores com comprimento de estigma intermediário que podem produzir frutos, embora em número reduzido.

A proporção de plantas com frutos foi inferior à observada para plantas com flores, variando de 11,8 a 62,5%; a média de frutos por planta também apresentou

valores inferiores de 1,2 a 5,4%. A variação na quantidade de frutos em lobeira encontrados ao longo do ano pode ser explicada por diversos fatores, portanto necessita de estudos aprofundados sobre o assunto. A primeira explicação pode ser baseada em Fracasso e Sazima (2004) que comentam que a frutificação em condições naturais pode estar relacionada à dinâmica de visita das principais espécies polinizadoras, influenciando o sucesso reprodutivo. A variação na quantidade de frutos em *S. lycocarpum* pode estar associada à presença e eficiência de polinização dos agentes visitantes. Outra explicação seria que a produção de frutos e de sementes são processos custosos para a planta em níveis energéticos, podendo a própria planta fazer tal regulação. Conforme apresenta a Figura 6, meses com grande quantidade de frutos foram seguidas por declínio na produção, formando dois picos de frutificação ao longo do ano. Quando a planta atinge um pico de frutificação, podem reduzir a produção de frutos, ou abortar outros recém-formados, evitando assim gastos energéticos desnecessários.

A formação de frutos por todo ano é vantajosa para espécies que ocupam áreas abertas, sujeitas aos diversos tipos de alterações, inclusive impactos antrópicos. Em *S. lycocarpum* é produzido um grande número de sementes, podendo variar desde poucas até muitas centenas (MARTINS, comunicação pessoal; MOURA et al. 2006; SUFFERT et al. 2006), aumentando a chance de germinação e estabelecimento da planta do ambiente de ocupação. Fatores como reprodução vegetativa e a utilização de mais de um grupo de polinizadores são características que favorecem a ocupação e permanência de espécies em ambientes sujeitos às alterações (SIGRIST; SAZIMA, 2002).

A grande ocorrência da lobeira em ambientes antrópicos pode ser decorrente de seus mecanismos reprodutivos, tais como grande quantidade de flores presentes durante todo o ano, elevado número de frutos e grande quantidade de sementes por fruto (MOURA et al. 2006), de fácil e rápida germinação (VIDAL et al. 1999). Ainda, pode estar envolvido além da presença de polinizadores ativos durante todo ano (MOURA et al. 2006), dispersor de sementes a longa distância (MARTINS; MOTTA JUNIOR, 2000), o fato de as plantas que ocupam margens de estradas exercerem função de *steeping stones* entre populações (MARTINS, 2005).

A facilidade de ocupação de ambientes antropizados pela lobeira, aliada a suas características reprodutivas, pode ser um facilitador de fluxo gênico nesta espécie. Outros fatores podem ser também os *steeping stones* conectando populações, o fluxo constante de pólen e sementes, pois esses são produzidos durante todo o ano, e seus principais polinizadores e dispersores são ativos durante todo este período.

5.2 Diversidade genética nos locos SSR em *S. lycocarpum*

O polimorfismo encontrado nas populações estudadas com locos SSR foi baixo para este tipo de marcador e muito similar ao observado em outros estudos genéticos populacionais realizados com a espécie. O número médio de alelos por loco foi de apenas 3,9 e a diversidade gênica foi (H_e) de 0,334. Comparando estes valores com a média calculada para espécies arbóreas tropicais e apresentada na Tabela 20, verifica-se o baixo polimorfismo presente na espécie. Moura (2004) estudando 2 populações em Morrinhos/GO encontrou resultados semelhantes aos obtidos neste estudo ($H_e = 0,343$ e $A = 3,3$). Similarmente, em outro estudo realizado com marcador SSR, para cinco populações de *S. lycocarpum* do estado de Goiás, foi encontrado um número médio de alelos por locos, variando de 3,88 e heterozigosidade esperada de 0,330 (MARTINS et al. 2006). O baixo número de alelos encontrados, provavelmente seja devido ao fato de os *primers* terem sido desenvolvidos para outro gênero da família Solanaceae (*Capsicum spp.*) e terem sido transferidos para *S. lycocarpum*. Zucchi et al. (2003), em estudos com *Eugenia dysenterica* também obtiveram valores próximos aos anteriormente citados ($A = 3,12$ e $H_e = 0,458$), ou seja, baixos valores de polimorfismo. Esta semelhança pode ser considerada devido ao fato de os *primers* para *E. dysenterica* também terem sido transferidos de outra espécie de mesma família (Myrtaceae), porém de gêneros diferentes (*Eucalyptus*). Os estudos de Collevatti et al. (2001b) corroboram com esta hipótese, pois esses autores verificaram em *Cariocar brasiliense*, utilizando *primers* desenvolvidos para esta espécie ($A = 10,6$ e $H_e = 0,856$), valores consideravelmente superiores aos obtidos para *S. lycocarpum* e *E. dysenterica*.

O loco que apresentou maior número de alelos foi o CA158 (20 alelos). No entanto, o número de alelos efetivos por loco foi significativamente reduzido ($\hat{A}_e = 5,26$),

indicando que apesar do elevado número de alelos, poucos desses têm alta frequência, sendo que a maioria tem baixa frequência. O menor valor de A_e foi para o loco CA161, ($\hat{A}_e = 1,004$); este valor reduzido é devido à presença de apenas um indivíduo heterozigoto na População 4 (Mn); a média do número efetivo de alelos por loco para as quatro populações estudadas foi $\hat{A}_e = 2,19$, valor semelhante ao encontrado por Martins *et al.* (2006), que obtiveram $\hat{A}_e = 2,32$.

Tabela 20 – Estimativa do índice de diversidade por loco SSR em espécies arbóreas tropicais. n =tamanho da amostra; nl = número de locos; \hat{A} = média do número de alelos por loco; $\hat{A}_e = 1/(1 - \hat{H}_e)$ = número efetivo de alelos por loco; H_e = Heterozigosidade esperada; H_o = Heterozigosidade observada

Espécies	n	nl	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_e	\hat{H}_o
<i>Carapa guianensis</i> ¹	24,7	3	14,7	3,99	0,665	0,662
<i>Caryocar brasiliense</i> ²	314	10	10,6	6,94	0,856	0,765
<i>Dinizia excelsa</i> ³	569	5	18,5	2,87	0,728	0,651
<i>Eugenia dysenterica</i> ⁴	11	7	3,1	1,79	0,442	0,458
<i>Pithecellobium elegans</i> ⁵	38,7	4	2,5	1,84	0,457	0,490
<i>Shorea curtisii</i> ⁶	108	3	12,0	4,60	0,769	0,735
<i>Shorea leprosula</i> ⁷	336	3	14,0	2,98	0,664	0,659
<i>Swietenia macrophylla</i> ⁸	194	8	18,4	6,71	0,851	0,749
<i>Swietenia humilis</i> ⁹	37	10	7,0	3,30	0,523	0,482
<i>Symphonia globulifera</i> ¹⁰	74	3	14,7	6,84	0,854	0,797
<i>Symphonia globulifera</i> ¹¹	164	3	23,0	8,02	0,870	0,730
<i>Vouacapoua americana</i> ¹²	23,6	9	4,1	2,02	0,506	0,467
Média			11,88	4,32	0,682	0,637

¹ (Dayanandan *et al.* 1999); ² (Collevatti *et al.* 2001b); ³ (Dick *et al.* 2003); ⁴ (Zucchi *et al.* 2003); ⁵ (Chase *et al.* 1996); ⁶ (Obayashi *et al.* 2002b); ⁷ (Nagamitsu *et al.* 2001); ⁸ (Lemes *et al.* 2003); ⁹ (White *et al.* 1999); ¹⁰ (Aldrich *et al.* 1998); ¹¹ (Degen *et al.* 2004); ¹² (Dutech *et al.* 2004).

5.3 Diversidade genética intrapopulacional

As probabilidades do teste exato de Fisher mostraram que, dos cinco locos de microssatélites nucleares utilizados nesse estudo, os locos CA158 e CA23 apresentaram desvios significativos das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações. Os demais locos não apresentaram desvios significativos (Tabela 8). No estudo realizado com *S. lycocarpum* por Martins (2005) o loco CA158 também não estava nas proporções esperadas pelo EHW em todas as

populações; no entanto resultados obtidos para o loco CA23 foram contrários ao encontrado neste estudo. Os resultados obtidos com isoenzimas neste estudo apresentaram resultados semelhantes: por exemplo, a População 4 (Mn) apresentou quatro locos em desequilíbrio, para os sete analisados.

Os pressupostos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg são populações infinitas, com ausência de mutação, migração, seleção e ocorrência de cruzamentos ao acaso (Weir, 1996). Considerando que locos microssatélites são teoricamente neutros e a taxa de mutação seja elevada em comparação com outros marcadores genéticos, os desvios são ainda baixos para serem considerados como suficiente para afetar as frequências alélicas de uma população. Os presentes desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem se explicados devido ao sistema reprodutivo da espécie: pode estar ocorrendo cruzamentos biparentais e endogâmicos, visto que aparentemente a espécie não se autofecunda. Contudo, Martins, et al. (2006) baseou seu estudo do sistema de reprodução em um número muito limitado de indivíduos por população (máximo 12). Considerando que o sistema de reprodução pode variar entre flores de uma planta, entre indivíduos de uma população, entre populações de uma espécie e entre diferentes eventos reprodutivos, é fundamental estudar o sistema de reprodução da espécie com base em uma amostra maior (pelo menos 25 árvores por população).

Pôde-se constatar a presença de alelos exclusivos nas populações. No entanto, neste estudo trabalhou-se com estimativas, portanto, diversos indivíduos e provavelmente diversos alelos não foram amostrados nas quatro populações estudadas. A População 4 (Mn), população natural pertencente ao Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, apresentou seis alelos exclusivos, número elevado quando comparado à população antrópica localizada no Sul do estado de Goiás (População 3, Ma), que apresentou dois alelos exclusivos. Estes alelos também apareceram em baixa frequência, sugerindo para a maioria deles que ocorreram apenas em um indivíduo heterozigoto na população. Outro fato interessante é que só foram encontrados alelos exclusivos em populações de uma região, sugerindo certo isolamento em relação às demais estudadas. Mesmo podendo ter ocorrido erro amostral, os dados permitem inferir maior diversidade genética nas populações situadas a Sul do estado de Goiás, especialmente a pertencente a uma unidade de conservação. Outro estudo baseado em

marcadores SSR e realizado em quatro populações naturais da espécie (MARTINS, 2005), corrobora o citado anteriormente, pois foram encontrados de 1 a 3 alelos exclusivos. Em uma quinta população, situada à margem da rodovia, não foram detectados alelos exclusivos. O resultado é semelhante ao encontrado neste estudo para esse marcador, pois a População 1 (Pa), também situada à margem de rodovia não apresentou alelos exclusivos. Quando são contrastadas as frequências alélicas das quatro populações aqui estudadas com as cinco do estudo de Martins (2005), verifica-se que as Populações 3 (Ma) e 4 (Mn) apresentam respectivamente 2 e 3 alelos exclusivos e três populações do estudo de Martins (2005) apresentam 1, 3 e 1 alelos exclusivos. A presença destes alelos exclusivos pode ser um indicativo de isolamento genético entre as populações.

O teste χ^2 demonstra que há diferenças significativas no número de alelos entre as populações estudadas com o marcador SSR. Os valores do teste apresentaram números significativos para as quatro populações, e para comparação entre populações naturais e antropizadas. Estes resultados permitem sugerir, conforme citado anteriormente, que há uma diferença significativa no número de alelos existentes em populações naturais e antropizadas, indicando que as populações naturais, provavelmente, conservam mais diversidade genética que as populações antropizadas. No entanto, esse mesmo teste não apresentou resultado significativo quando utilizado para as populações estudadas com o marcador isoenzimático. Isto pode ser justificado por fatores já comentados anteriormente, como por exemplo, os locos isoenzimáticos não representam os mesmos locos SSR, podendo de fato não haver diferença significativa. Ou ainda, pode ser sugerido erro amostral, pois uma das populações - população 5 (Ma) consistia de uma amostra de 41 indivíduos, valor menor quando comparado a outra população deste estudo - população 4 (Mn), e as quatro populações estudadas com os locos SSR.

O resultado obtido neste estudo pode realçar a importância das áreas de preservação para conservação dos recursos genéticos da espécie, pois o Parque Estadual da Serra de Caldas Novas foi a única Unidade de Conservação amostrada neste estudo, e foi a população que apresentou maior diversidade de alelos e maior número de alelos exclusivos. Se comparado os resultados obtidos para essa população

com os resultados encontrados por Martins et al. (2006), a população situada na Serra de Caldas Novas igualmente encontrada neste estudo apresenta maior diversidade de alelos e maior número de alelos exclusivos. Importante ressaltar que estes autores não amostraram nenhuma população situada em Unidade de Conservação. No entanto, resultados com marcadores isoenzimáticos apresentaram maior número de alelos exclusivos na área antrópica (1) que na área natural (2). Apesar de ser um resultado contrastante, a variação foi significativamente reduzida, apenas um alelo, e os locos isoenzimáticos não representam os mesmos locos microssatélites.

O número de alelos por loco, considerando o marcador isoenzimático, foi maior na população antropizada ($\hat{A} = 2,00$) do que na população não antropizada ($\hat{A} = 1,86$). No entanto, para os marcadores microssatélites, o número de alelos por loco foi maior nas duas populações naturais - População 4 (Mn) ($\hat{A} = 5,20$) e População 2 (Pn) ($\hat{A} = 4,20$) - do que nas antropizadas - População 3 (Ma) ($\hat{A} = 3,60$) e População 1 (Pa) ($\hat{A} = 2,60$), sugerindo que a antropização tenha reduzido o número de alelos nas populações. O mesmo é observado avaliando-se o número total de alelos detectados nos locos. As duas populações antropizadas apresentaram menor número de alelos. Martins (2005) obteve maior número de alelos por loco ($\hat{A} = 4,20$) em duas populações naturais; no entanto, os valores encontrados para as outras populações naturais e a antropizada não apresentaram grandes variações. Essa autora encontrou número médio de alelos por loco de 3,88 para as cinco populações estudadas, valor muito próximo ao encontrado neste estudo, onde foi observado $\hat{A} = 3,90$.

As populações das duas diferentes regiões apresentaram um padrão de diversidade genética diferente. Nas duas populações situadas ao Sul de estado de Goiás, os valores encontrados para a heterozigidade observada (H_o) foram ligeiramente superiores ao encontrado para diversidade gênica (H_e), no entanto a endogamia não foi significativa, sugerindo que esta diferença encontrada entre as estimativas de heterozigidade não são estatisticamente significativas. O mesmo pode ser afirmado para resultados obtidos com marcadores Isoenzimáticos e demais locos SSR, pois, apesar de se ter observado o valor de \hat{H}_e superior ao de \hat{H}_o , igualmente ao encontrado por Martins (2005), o índice de fixação (\hat{f}) não foi significativamente

diferente de zero para nenhuma das populações para ambos os marcadores, em ambos os estudos, sugerindo ausência de endogamia dentro das populações estudadas. Contudo, embora não tenham sido observados valores estatisticamente diferentes de zero para o índice de fixação, existe uma tendência: as populações 1 (Pa) e 2 (Pn) apresentam um excesso de homozigotos e as populações 3 (Ma) e 4 (Mn), de outra região, apresentaram excesso de heterozigotos. Esses resultados podem ser devidos ao sistema de reprodução da espécie, bem como ao tipo de polinizador conforme descrito por Oliveira Filho e Oliveira (1988). Ainda podem ser associados ao comportamento dos principais dispersores de sementes, encontrado em Rodrigues (2002), além da ampla distribuição da espécie pelo bioma e constante atividade reprodutiva durante todo o ano, e os indivíduos existentes nas margens de estradas, que favorecem fluxo gênico entre populações (MARTINS, 2005).

5.4 Estrutura genética populacional

Pelos resultados obtidos com os locos microssatélites, a divergência genética entre populações diferiu estatisticamente de zero ($R_{ST}=0,076$, I.C. 0,061 a 0,103), indicando que 7,6% da diversidade genética encontra-se entre as populações estudadas, obtendo um fluxo gênico equivalente a $Nm = 3,00$ (0,27 a 3,62). Utilizando-se outra estimativa de diferenciação genética, obtiveram-se valores semelhantes, $\hat{\theta}_p = 0,095$ (I.C.= 0.002 a 0.283), $Nm = 1,34$ (0,36 a 0,17). Entretanto, utilizando a estimativa $\hat{G}_{ST(Hedrick)}$, os valores obtidos foram consideravelmente diferentes ($\hat{G}_{ST(Hedrick)} = 0,167$ e $Nm = 0,70$). O intervalo de confiança apresentou não significativo para esta estimativa, entretanto, conforme comentado, isto é atribuído à amostragem, seria necessário que tivesse sido utilizado maior número de locos com maior polimorfismo, que os utilizados neste estudo. Os resultados conferem com o afirmado por Hamrick e Godt (1990) que observaram que, em média 82% da variabilidade genética encontram-se dentro das populações. Considerando a estimativa $\hat{G}_{ST(Hedrick)}$ observa-se que 16,7% da divergência genética encontra-se entre populações, ou seja, 83,3% da divergência está situada dentro das populações.

A estimativa da diferenciação genética entre as populações, medida pelo método de Hedrick (2005), foi alta e levemente superior à estimada pelo método de Weir e Cockerham (1984), confirmando as diferenças genéticas entre as populações. A superioridade na estimativa obtida pelo método de Hedrick (2005) se deve às peculiaridades do método, que considera não só a frequência dos alelos, como também o tipo de alelo presente nas populações, na estimação da medida de diferenciação genética entre populações. O método de Weir e Cockerham (1984), igualmente como à clássica estatística F_{ST} , é muito dependente dos níveis de heterozigosidade presentes dentro das populações, independente do tipo de alelos. Por exemplo, suponha-se um loco onde segregam 4 alelos, sendo que dois alelos ocorrem em uma população e dois em outra população; no caso, não existem alelos comuns nas populações. Suponha-se também que a frequência destes alelos é 0,5; logo a heterozigosidade esperada em ambas as populações é igualmente 0,5. Neste caso, como a heterozigosidade esperada é igual nas duas populações, e a heterozigosidade esperada média entre elas é igualmente 0,5, a diferenciação genética medida pela estatística F_{ST} será de apenas 33%, mesmo que todos os alelos sejam exclusivos (ver HEDRICK, 2005, para mais detalhes). O esperado seria encontrar uma diferenciação de 100%. Portanto, o uso da estatística F_{ST} , e mesmo o cálculo de θ_p com base em Weir e Cockerham (1984), que também é dependente da variação genética dentro das populações (correlações intraclasses), vai sempre subestimar a verdadeira diferenciação genética entre populações, diante daquelas contendo alelos exclusivos.

Estes últimos valores apresentados indicam alta divergência entre as populações e baixo fluxo gênico, que pode ser justificado pelo número de alelos exclusivos encontrados em uma delas. Martins et al. (2006) encontraram baixa divergência genética em *S. lycocarpum* para marcadores SSR nucleares ($\hat{\theta}_p = 0,054$, IC= 0,0039 a 0,139; $\hat{R}_{ST} = 0,031$, IC= 0,025 a 0,059) e obtiveram 4,42 migrantes por geração, valor semelhante ao encontrado neste estudo para essas mesmas estimativas, onde foram encontrados 3,0 migrantes por geração, embora se tenha observado fluxo gênico a distâncias maiores do que no estudo anteriormente citado. No entanto, para as estimativas de Hedrick, o fluxo gênico foi consideravelmente restrito, o

que sugere que o mesmo pode ocorrer com as populações estudadas por Martins et al. (2006), pois ocorreu a presença de alelos exclusivos nas populações naturais estudadas por estes autores. O mesmo pode ser afirmado para o estudo com marcador isoenzimático, uma vez que foi obtido $\hat{\theta}_p = 0,081$ (IC 0,016 a 0,137) e $\hat{G}_{ST(Hedrick)} = 0,102$ (0,004 a 0,060), indicando uma maior divergência se considerada esta segunda estimativa apresentada. Ainda, utilizando as frequências alélicas apresentadas para as cinco populações do trabalho de Martins (2005) para calcular a diferenciação genética entre as do presente estudo, observou-se uma diferenciação de 5,4% entre as nove populações. A redução nos níveis de diferenciação se deve ao fato de que as populações de Martins (2005) estão localizadas entre as populações do presente estudo. Locos encontrados com apenas um alelo foram também encontrados aqui. A diferenciação entre as populações foi baixa, como esperado. Este resultado sugere coerência na interpretação dos locos SSR e que os resultados têm confiabilidade.

Kageyama et al. (2003), utilizando locos isoenzimáticos, observaram que apesar da presença de alelos exclusivos e das diferenças aparentes nas frequências alélicas entre populações de *Ocotea odorifera*, a divergência genética ($\hat{\theta}_p$), foi baixa (2,8%). Resultado coerente ao obtido neste estudo, considerando a estimativa $\hat{\theta}_p$, porém com uma maior divergência genética entre populações de lobeira, provavelmente devido ao fato de as populações desta espécie estar localizadas a uma distância maior.

Nos estudos com locos isoenzimáticos, em concordância com os níveis de diferenciação genética entre populações, a estimativa do fluxo gênico histórico ($Nm = 0,71$ e $0,55$) foi menor do que a unidade (1,0), sugerindo baixa taxa de fluxo gênico. Este resultado é coerente, considerando a grande distância separando as populações. É muito pouco provável que exista um fluxo direto e contínuo entre estas populações. O mais provável é que exista fluxo contínuo entre populações adjacentes, existentes nas estudadas. Esta hipótese é coerente com o resultado obtido envolvendo as populações de Martins (2005). A taxa de fluxo gênico histórico passa a ser de 3,44 migrantes por geração.

Novamente, embora os níveis de fixação de alelos para a média e para o conjunto das duas populações tenham sido positivos, a estimativa do intervalo de

confiança a 95% de probabilidade para os resultados das estatísticas F sugere a ausência de endogamia nas populações (Tabela 16). Por outro lado, a medida de diferenciação genética entre populações indicou significativa divergência genética entre as estudadas. Este nível de diferenciação pode ser considerado mediano e era esperado, considerando a detecção de alelos exclusivos em ambas as populações e diferenças nas frequências alélicas, como anteriormente discutido.

5.5 Taxa de cruzamento e distribuição espacial intrapopulacional

É de fundamental importância conhecer o sistema de cruzamento de uma espécie, pois este determina como os genes são transmitidos de uma geração para a outra e como são reorganizados nos indivíduos, determinando sua estrutura genética espacial e temporal (SEBBEN et al. 2000). Estes autores ainda comentam que o sistema de cruzamento deve ser o primeiro passo a ser seguido para o conhecimento genético de uma espécie. A taxa de cruzamento aparente (\hat{t}_a) apresentou padrões significativamente diferentes para os dois marcadores moleculares. Para o marcador molecular SSR, o valor apresentou próximo a unidade, indicando que a espécie se reproduz predominantemente por cruzamentos. Ainda para este marcador, houve diferença entre as duas regiões estudadas, pois na região Nordeste a taxa de cruzamento média entre as duas populações foi de 0,836, indicando que a taxa de autofecundação corresponde a 16,4%. Já na região Sul, pode-se constatar 100% de cruzamento nas duas populações estudadas. O coeficiente de endogamia (\hat{f}) foi negativo para as duas populações situadas nessa região, sendo assim o valor estimado para a taxa de cruzamento é igual à unidade. Não se sabe ao certo o motivo desta diferença na taxa de cruzamento, entre as duas regiões, mas provavelmente existe na região sul algum fator que está favorecendo a fecundação cruzada nestas populações, pois, o esperado para espécies arbustivas/arbóreas tropicais é que estas sejam predominantemente alógamas, com pequenas taxas de autofecundação. Contudo, como comentado, a taxa de cruzamento pode variar entre flores de uma árvore, entre árvores de uma população, entre populações e entre diferentes eventos reprodutivos. Esta variação pode ter origem genética ou ambiental e pode ser afetada por efeitos

antrópicos. Uma das possíveis explicações é a antropização da população levando a variações no sistema de reprodução. O valor médio de t_a obtido para as quatro populações estudadas com locos SSR foi 0,918.

Em concordância as altas taxas de cruzamento, Martins (2005) analisando sistema de cruzamento em *S. lycocarpum* e estimou a taxa de cruzamento multiloco t_m e verificou que esta apresenta valores próximos a 1, indicando, conforme comentado, que é predominantemente de cruzamentos. A estimativa utilizada por essa autora indica resultados mais reais de taxa de cruzamento, pois o cálculo é realizado utilizando progênies. A t_a é baseada em plantas de uma dada geração, portanto resultado menos acurado que t_m .

Entretanto, valores consideravelmente divergentes foram encontrados para os marcadores isoenzimáticos. Na população 4 (Mn) verificou-se taxa de cruzamento (0,627) superior a encontrada na área antropizada população 5 (Ma) $\hat{t}_a=0,558$. A taxa de cruzamento médio entre as duas populações estudadas com este marcador sugerem uma taxa de autofecundação de aproximadamente 41%. Marcadores SSR e isoenzimáticos, não representam as mesmas regiões no genoma das plantas, e divergências encontradas, nos resultados obtidos com estes dois marcadores, são esperadas.

Existe outro fator a ser considerado. O coeficiente de endogamia (\hat{f}) não foi significativo para todas as populações, ou seja, não diferiram estatisticamente de zero. Considerando o \hat{f} igual a zero, a taxa de cruzamento aparente passa a ser a unidade em todas as populações. Caracterizando alogamia. No entanto, essa divergência de valores encontrados para \hat{t}_a entre esses dois marcadores deve ser mais bem analisada, não permitindo, por hora, conclusões sobre esta divergência.

Quando em uma população ocorre menor taxa de cruzamento, que o esperado pelo equilíbrio de Wright, como observado para os locos isoenzimáticos, provavelmente haverá uma maior distância genética entre as plantas. O conhecimento dos níveis de variabilidade genética, forma de reprodução e distribuição espacial dos genótipos

dentro das populações são aspectos fundamentais quando se pretende a conservação *in situ* de uma espécie (SEBBEN et al. 1998).

O padrão da distribuição espacial, ou a estrutura da diversidade genética dentro de populações é um componente importante dos processos genético-ecológicos e evolucionários de populações naturais de plantas. O agrupamento genético espacial é determinado pelos mecanismos de dispersão de pólen e sementes (GUSSON et al. 2005).

A distribuição espacial para as duas populações analisadas com locos SSR, apresentou padrões de estruturação genética. A População 1 (Pa) apresentou estrutura genética espacial entre indivíduos distantes entre si em até 60 m, aproximadamente. A População 4 (Mn) indica que indivíduos próximos até uma distância, em torno, de 1292 m também apresentam distribuição genética espacial. Vekemans e Hardy (2004) considera que a estrutura genética espacial é significativamente maior em populações com baixa densidade. Isto pode justificar a diferença de padrão encontrado entre as populações 1 (Pa) e 4 (Mn), para locos SSR. A População 1 (Pa) está situada a margem da rodovia, e como em ambientes antrópicos a lobeira ocorre em maior densidade que em áreas naturais, como a população 4 (Mn), isto pode justificar a maior correlação encontrada nesta população. A existência de indivíduos geneticamente correlacionados (aparentados), localizados próximos, dentro das populações, podem ser indicativos da existência de cruzamentos endogâmicos (SEBBEN et al. 1998) e que as sementes são dispersas próximas a árvore materna. Porém não foi encontrada endogamia significativa entre as populações estudadas, conforme comentado anteriormente.

Para as três populações analisadas pode-se verificar que indivíduos próximos geograficamente também são geneticamente próximos, conforme esperado para a espécie, pois é comum que em campo esta esteja agrupada em forma de moitas. Estas moitas podem ser resultantes de propagação vegetativa de raiz, neste caso, todos os indivíduos seriam geneticamente idênticos; por dispersão restrita de sementes, os frutos frequentemente caem sob a planta mãe, podendo ocorrer germinação das sementes, e assim o agrupamento ser constituído de indivíduos aparentados; e ainda devido ao mecanismo de polinização, que é feito por abelhas do gênero *Xylocopa* (OLIVEIRA

FILHO; OLIVEIRA, 1998), que visita várias plantas na população e são de vôo curto, favorecendo o fluxo gênico a curtas distâncias.

Martins (2005) observou a correlação espacial de quatro populações de *S. lycocarpum* utilizando marcadores nucleares e cloroplastidiais, observou que em duas das populações estudadas houve cruzamento preferencial entre indivíduos a uma distância em torno de 50 m. A autora ainda acredita que restrição na dispersão de sementes e propagação vegetativa tenha contribuído para a correlação espacial entre estas populações. Soares (2006), em estudos com *Dipterix alata*, também verificou que o “barueiro” pode-se apresentar sobre formas de agrupamentos homogêneos, e verificou que, para esta espécie, pode-se observar uma tendência a autocorrelação espacial entre os indivíduos mais próximos fisicamente.

5.6 Tamanho efetivo populacional

O tamanho efetivo populacional é um parâmetro crítico em genética de populações, pois este é uma medida da taxa de deriva genética e endogamia (VENCOVSKY; CROSSA, 2003). O tamanho efetivo de populações é o tamanho de uma população idealizada, que tem a mesma medida de deriva em frequência alélica, ou a mesma taxa de redução em heterozigosidade, igual a população atual (VENCOVSKY; CROSSA, 2003). O Tamanho efetivo, da amostragem, das populações estudadas com locos SSR, não apresentaram grandes variações. Nas populações situadas a Sul do estado o valor de N_e foi exatamente igual ao tamanho físico da amostra, devido ao fato de o índice de fixação nestas populações ter sido negativos, e então, assumiu-se o valor zero para estes. Na Região Nordeste, município de Alto Paraíso, o tamanho efetivo N_e apresentou próximo ao tamanho da amostra (55,97; 54,24), para as populações 1 (Pa) e 2 (Pn), respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados por Martins (2005) que atribui o resultado encontrado, ao fato de os níveis de endogamia ter sido reduzido.

Considerando o marcador Isoenzimático, o valor de N_e foi reduzido quando comparado ao marcador SSR. A população natural apresentou tamanho efetivo maior que a população antropizada, mas isto é atribuído ao fato de que foram amostrados

menos indivíduos na população antropizada (41), que na população natural (60). Estes valores não representam o N_e da população, e sim da amostra. Um exemplo de aplicabilidade para esta análise é, por exemplo, se desejar realizar conservação *ex situ* da espécie. Coletando frutos de 60 plantas obterá o N_e , para o conjunto de sementes, de aproximadamente o tamanho da amostra.

Considerando os valores encontrados para o índice de fixação (f) e tamanho efetivo populacional (N_e), pode-se considerar especificamente em *S. lycocarpum*, que populações antrópicas estão exercendo um importante papel na conservação da espécie. Apesar de o número de alelos nos ambientes antropizados terem sido reduzidos em relação às áreas menos antropizadas, o coeficiente de endogamia não diferiu de zero e não houve diferença marcante do tamanho efetivo para ambos os ambientes. Isso indica, conforme já comentado por Martins (2005) que populações antrópicas de lobeira podem estabelecer conectividade entre populações naturais, funcionando como “stepping stones”, e atuar evitando a redução do tamanho efetivo das populações. Outras estimativas de tamanho efetivo são utilizadas em genética de populações, sendo estas de real importância para conservação das espécies. Referindo às populações fragmentadas, ou subpopulações, é possível estimar o N_e por meio da divergência genética existentes entre as subpopulações, neste caso quanto maior o valor estimado para F_{ST} menor será o N_e do conjunto de subpopulações.

O tamanho efetivo para o conjunto de populações estudadas com locos SSR, foi consideravelmente reduzido quando comparado ao amostrado dentro das populações. Obteve-se $\hat{N}_{e(v)}=20$. O mesmo cálculo realizado em quatro populações estudadas por Martins (2005) apresenta valores de $\hat{N}_{e(v)}=33,3$. Este maior valor encontrado por essa autora é devido ao fato de a divergência genética entre as populações, estudada por essa, ser menor ($\hat{\theta}_p = 0,053$) que o encontrado no presente estudo ($\hat{\theta}_p = 0,095$). Esta menor divergência, conforme discutido anteriormente, é porque as populações estudadas por Martins (2005) estão localizadas mais próximas entre si do que as populações aqui apresentadas.

O valor encontrado para tamanho efetivo, analisando conjuntamente as duas populações estudadas com locos isoenzimáticos, apresentou valor inferior àquele obtido com locos SSR $N_{e(v)} = 11,11$. A redução deste valor se deve principalmente a redução do tamanho amostral, pois foram estudadas quatro populações (240 indivíduos) com locos SSR e duas populações (101 indivíduos) com locos isoenzimáticos.

Para fazer uma comparação mais realista entre os locos SSR e locos Isoenzimáticos foi calculado o valor de $N_{e(v)}$ para as duas populações estudadas com SSR no sul de Goiás. Encontrando para $\hat{N}_{e(v)} = 11,9$. Valor bastante próximo ao obtido com marcadores Isoenzimáticos.

Segundo Vencovsky e Crossa (1999), é possível determinar o número de populações que devem ser conservadas para reter um tamanho efetivo de 500. O tamanho efetivo 500 deve ser considerado quando é pretendido um plano de conservação em longo prazo. O valor encontrado, para o conjunto de populações estudadas com locos SSR, foi de $\hat{S}_{(ref)} = 95$. Valor consideravelmente superior ao encontrado por Martins (2005). Esta autora indica que em torno de 54 populações de *S. lycocarpum* devem ser conservadas pra reter um tamanho efetivo de 500. Esta discrepância em valores é devido ao fato que esta estimativa é baseada na divergência entre as populações ($\hat{\theta}_{p(Martins)} < \hat{\theta}_{p(Pr\ esente_estudo)}$). Em outras palavras, quanto maior for o valor encontrado para a divergência genética entre populações, maior deverá ser o número de populações a serem conservadas para reter um tamanho efetivo de 500.

Quanto maior a divergência existente entre populações, maior deverá ser o número de áreas de conservação para garantir um tamanho efetivo apropriado. Chaves (2006) comenta que, em prática, é impossível manter uma amostragem adequada em reservas públicas, sendo essencial considerar as reservas legais de propriedades privadas em um programa de conservação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu as seguintes considerações:

1. O florescimento de *S. lycocarpum* apresentou correlação positiva com a precipitação;
2. Considerando locos SSR, ocorreu número de alelos significativamente maior em populações naturais que nas populações antropizadas;
3. Não foi observada endogamia significativa dentro das populações estudadas;
4. Houve diferenças na medida de divergência genética entre as populações estudadas para os dois tipos de marcadores moleculares;
5. A estimativa do $G_{ST(Hedrick)}$ apresentou valores de divergência genética maiores e fluxo gênico mais restrito, do que para as outras estimativas analisadas (θ_p e R_{ST});
6. Não foi verificada diferenciação relevante entre os resultados obtidos com marcadores SSR e isoenzimáticos;
7. É necessário que seja desenvolvido *primers* específicos para *S. lycocarpum*, pois, esta espécie apresenta uma importância ecológica marcante, e por isso, deve ser mais bem estudada.

REFERENCIAS

- AGUIAR, A.V. **Emprego de parâmetros moleculares e quantitativos na conservação e melhoramento de *Eugenia dysenterica* DC.** 155p. 2004. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.
- AGUIAR, L.M.S.; MACHADO, R. B.; MARINHO-FILHO, J. A Diversidade biológica do Cerrado. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. **Cerrado: ecologia e caracterização.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. cap. 1, p. 17-40.
- ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J. L.; CHAVARRIAGA, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented population of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 8, p. 933-944, 1998.
- ALHO, C.J.R. Desafios para a conservação do Cerrado, em face das atuais tendências de uso e ocupação. IN: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação.** Brasília: MMA, 2005. cap. 22, p. 369-381.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis.** Planaltina: EMBRAPA – CPAC. 1998. 464 p.
- BARREIRA, S. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropapus* (DC.) MacLeish como base para o Manejo Florestal.** 61p. 2005. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BRONDANI, R.P.V.; BONDARI, C.T.R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical Applied Genetics**, Nova York, n. 97, p. 816-827, 1998.
- BRUNE, W.; ALFENAS, A.C.; Modalidades da Eletroforese. In: ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de Isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. p.25-83.
- BORGHETTI, F. ; PESSOA, D.M.A. Autotoxicidade e alelopatia em sementes de *Solanum lycocarpum* St. Hill. (Solanaceae). In: LEITE, L. L.; SAITO, C. H. (Org.). Contribuição ao conhecimento ecológico do Cerrado – In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 1996. Brasília. **Anais...** Brasília: Universidade de Brasília, 1997.

BUSO, G.S.C.; BRONDANI, R.V.; AMARAL, Z.P.S.; REIS, A.M.M.; FERREIRA, M.E. **Desenvolvimento de primers SSR para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum spp.*) utilizando biblioteca genômica enriquecida.** Embrapa/Cenargen, Brasília: 2000. p. 1-27. (Boletim de pesquisa,15)

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T (ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa: UFV, 2006. cap. 1, p.9-68.

CARVALHO, D.; TORRES, G.A. **Marcadores moleculares.** Lavras: UFLA, FAEPE, 2002. 35 p.

CENTENO, A.J. **Curso de estatística aplicada à biologia.** Goiânia: UFG, 2002. 234 p.

CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Distant gene flow in tropical tree. **Nature**, Londres, v.383, p. 398-399, out/1996.

CHAVES, L.J. Recursos genéticos no Cerrado. In: SILVA JUNIOR, J.F. ; LEDO, A.S. (Org.). **A Cultura da mangaba.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 75-84.

CHAVES FILHO, J.T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 199-204, jun, 2001.

CHAVES, L.J. Melhoramento e conservação de espécies frutíferas do Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS 1., 2001, Goiânia. **Anais.** Goiânia: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2001.

CIAMPI, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. **Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – *Caesalpiniaceae*) estimada com polimorfismo de AFLP, microssatélites e sequenciamento de cpDNA.** Brasília: Embrapa, 2001, (Boletim de Pesquisa, 12).

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

COURTENAY, O. Conservation of the Maned Wolf: Fruitful relations in a changing environment. **Canid news**. n. 2, jan.1994.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 19, p. 299-306, 2001.

CROW, J.F.; AOKI, K. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 81, p. 607- 677, 1984.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular ecology**, Oxford, v. 8, n. 11, p.1585-1592. 1999.

DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS – Spatial Genetic Software: A computer program for analysis of spatial genetics and phenotypic structures of individuals and populations. **Journal of Heredity**, Washington, v. 92. n. 5, p. 447-448, 2001.

DEGEN, B. GDA_NT: **Genetic data analysis e numerical tests**. Institute for Forest Genetics Sieker Landstrasse 2 D-22927, Grosshansdorf. Alemanha. Fev.2006

DEGEN, B.; BANDO, E.; CARON, H. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. **Heredity**, Londres, v. 93, n. 6, p. 585-591, 2004.

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil**: desafios e oportunidades. Campinas: s.n., 1996.

DICK, C.W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 753-764, 2003.

DUTECH, C.; JOLY, H.Y.; JARNE, P. Gene flow, historical populations dynamics and genetic diversity within French Guiana populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. **Heredity**, Londres, v. 92, p. 69-77, 2004.

EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**. Bronx, v. 38, p. 201-341, 1972.

ELIAS, S.R.M.; ASSIS, R.M.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; REZENDE, M.H. Anatomia foliar em plantas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 169-174, jun.2003.

Embrapa: O Cerrado Brasileiro. Disponível em <http://cerradobrasil.cpac.embrapa.br/>>. Acesso em 10 out. 2006.

FELFILI, J.M.; SILVA JUNIOR, M.C. Diversidade alfa e beta no Cerrado *sensu strictu*, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Bahia. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, 2005. cap. 7, p.143-178.

FELFILI, J.M.; SOUSA-SILVA, J.C.; SCARIOT, A. Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado: avanços no conhecimento. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, 2005. p. 27-44.

FELFILI, F. M.; RIBEIRO, J.F.; BORGES FILHO, H.C.; VALE, A. T. Potencial econômico da biodiversidade do Cerrado: estágio atual e possibilidades de manejo sustentável dos recursos da flora. In: AGUIRA, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. (Ed.) **Cerrado: ecologia e caracterização**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. cap. 6, p. 117-217.

FELFILI, J.M.; SILVA JUNIRO, M.C.; REZENDE, A.V.; HARIDANSAN, M.; FILGUEIRAS, T.S.; MENDONÇA, R.C.; WALTER, B.M.T.; NOGUEIRA, P.E.O projeto Biogeografia do Bioma Cerrado: Hipóteses e Padronização da Metodologia. **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis. p.157-173, 2001.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C. Genealogias e o processo de coalescência. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 16, p. 162-171.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa – Cenargen, 1998. 220p.

FRACASSO, C.M.; SAZIMA, M. Polinização de *Cambessedesia hilariana* (Kunth) DC. (Melastomataceae): sucesso reprodutivo *versus* diversidade, comportamento e frequência de visita de abelhas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 797-804, 2004.

FRANCO, A.C. Biodiversidade de forma e função: implicações ecofisiológicas das estratégias de utilização de água e luz em plantas lenhosas do Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J. M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, 2005. cap. 10, p. 181-196.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002, 631 p.

GAIOTTO, F.A. **Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. Utilizando marcadores microsatélites**. 2001. 122p. Tese. (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GUSSON, E.; SEBBEN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 67, p. 123-135, abr.2005

GOODMAN, S.J. R_{ST}Calc: a collection of computer programs for calculating estimates fo genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 881-885,1997.

GOUDET, J. F_{STAT} version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, Washington: v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 743 p.

GUIMARÃES, E.F.T. **Eletroforese de Isoenzimas: Relatório de estágio curricular II**. 2006. 30p. Monografia (Graduação em Ciências Florestais) - Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva - FAIT, Itapeva, 2006.

GUIMARÃES, E.F.T.; MOURA, T.M.M.; DEFAVARI, G.R.; BARREIRA, S. **Estabelecimento de protocolo para revelação isoenzimática para *S. lycocarpum* St.Hil.** In: SICUSP, 2006. Itapeva. Trabalho apresentado na Jornada de Iniciação Científica FAIT, 2006.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.) **Plant Population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1990, p. 43-63.

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, Lancaster, n. 58, p. 1633-1638, 2005.

HENRIQUES, R.P.B. Influencia da história, solo e fogo na distribuição e dinâmica das fitofisionomias no bioma Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, 2005. cap. 3, p. 75-92.

IBGE: Mapas Interativos. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/mapas/>. Acesso em 10 abril 2007.

KAGEYAMA, P.Y. **Variação genética entre procedências de *Pinus oocarpa* Schiede na região de Agudos – SP**. 1977. 83p. Dissertação (Agronomia – área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1977.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; VENCOSKY, R. Conservação in situ de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, cap. 7, p. 149-158.

KAGEYAMA, P.Y.; CUNHA, G.C.; BARRETO, K.D.; GANDARA, F.B.; CAMARGO, F.R.A.; SEBEN, A.M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia Florestalis**. Piracicaba, n.64, p. 108-119, dez.2003.

LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, n. 12, v. 11, p. 2875-2883, 2003.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). Free program distributed by the author over the Internet from the GDA Home page at: <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/,2000>.

LIMA, J.E. F.W.; SILVA, E.M. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, 2005. cap. 2, p. 63-72.

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

MARTINS, K.; MOTTA JUNIOR, J.C. The maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae), as seed disperser of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in Southeastern Brazil: a test with captive animals. INTERNATIONAL SYMPOSIUM-WORKSHOP ON FRUGIVORES AND SEED DISPERSAL 3., 2000. São Pedro: **Resumo**. 2000. p.217.

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

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 15, p.153-161.

MELO, J.T.; SILVA, J.A.; TORRES, R.A.A.; SIVEIRA, C.E.S.; CALDAS, L.S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa – CPAC, 1998. capítulo 5, p.196-243.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRA, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998. cap 7, p.289-556.

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

MOURA, T.M. **Biologia reprodutiva e estrutura genética populacional em lobeira do Cerrado (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) no município de Morrinhos - GO**. 2004. 83p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Goiás, Morrinhos. 2004.

MOURA, T.M.; MORENO, M.A.; OLIVEIRA, G.C.X.; KAGEYAMA, P.Y. Biologia reprodutiva em lobeira-do-cerrado (*Solanum lycocarpum* St. Hil.): floração, frutificação e frequência de visitantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 57., Gramado: 2006. **Resumo**. 1CD-ROM.

NAGAMITSU, T.; ICHIKAWA, S.; OZAWA, M.; SHIMAMURA, R.; KACHI, N.; TSUMURA, Y.; MUHAMMAD, N. Microsatellite analysis of the breeding system and seed dispersal in *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae). **International Journal Plant Sciences**, Chicago, n.162, v.1, p.155-159, 2001.

OBAYASHI, K.; TSUMURA, Y.; IHARA-UJINO, T.; NIIYAMA, K.; TANOUCHI, H.; SUYAMA, Y.; WASHITANI, I.; LEE, C.T, LEE, S.L.; MUHAMMAD, N. Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forest of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis. **International Journal Plant Science**, Chicago, v.163, n.1, p.151-158, 2002.

OLIVEIRA, K.A.K.B. (c). **Variabilidade genética entre e dentro de populações de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) do estado de Goiás**. 1998. 105p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 1998.

OLIVEIRA, P.E. (a). Fenologia e reprodução de espécies. In: RIBEIRO, J. F. (Ed.) **Cerrado: mata de galeria**. Planaltina: Embrapa – CPAC, 1998. cap. 5, p. 87-93.

OLIVEIRA, P.E. (b) Fenologia e biologia reprodutiva de espécies de Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa – CPAC, 1998. capítulo 4, p.170-192.

OLIVEIRA FILHO, A.T.; OLIVEIRA, L.C.A. Biologia floral de uma população de *Solanum lycocarpum* St. Hill. (Solanaceae) em Lavras MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.11, n.1/2, p.23-32, 1988.

PEREIRA, M.F.; VALVA, F.D.; COELHO, A.S.G.; AGUIAR, A.V.; ZUCCHI, M.I. Estrutura genética de populações de espécies arbóreas nativas do Cerrado encontradas em terrenos serpentínicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.34, n.2, p.75-82, 2004.

PIEDADE-KILL, L.H.; RANGA, N.T. Biologia Floral e sistema de reprodução de *Jacquemontia multiflora* (Choisy) Hallier f. (Convolvulaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, n.1, p.37-43, 2000.

PIJL, L. VAN DER. **Principles of dispersal in higher plants**. 2nd ed. New York: Springer – Verlag, 1972. 161p.

RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S.; RATTER, J.A.; SOUSA-SILVA, J.C. Ocupação do bioma Cerrado e conservação da sua diversidade vegetal. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: MMA, 2005. cap. 23, p.385-399.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de Isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p.329-380.

RODRIGUES, F.H.G. **Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF.** 2002. 96p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade de Campinas, Campinas. 2002.

RODRIGUES, R.R.; TORRES, R.B.; MATTHES, L.A.F.; PENHA, A.S. Tree Species Sprouting from Root Buds in a Semideciduous Forest Affected by fires. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n.1, p.127-133, 2004.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc 1.70**, numerical taxonomy and multivariate analysis system (Compact disc). Setauket: Applied Biostatistics, 1992. 1CDROM.

SANTOS, M.O.; COELHO, A.D. F.; MONTANARI, R.M.; PINTO, E.S.; VICCINI, L.F. Variabilidade genética entre populações de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. HIL.). **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.9, n.1, p.158-164, 2002.

SCHNEIDER, M .P.C.; BATISTA, C.G.; CARVALHO, D. ; CERQUEIRA, R.; CIAMPI, A.Y.; FRANCESCHINELLI, E.V.; GENTILE, R.; GONÇALVES, E.C.; GRATIVOL, A. D.; NASCIMENTO, M.T.; POVOA, J.R.; VASCONCELOS, G.M.P.; WADT, L.H.; WIEDERHECKER, H.C. Genética de Populações Naturais. IN: RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, A S. (org.) **Fragmentação de ecossistemas. Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas.** Ministério do Meio Ambiente, Biodiversidade 6. Brasília: MMA/SBF, 2003. cap. 11, p.298-313.

SEBBEN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n.53, p.15-30, 1998.

SEBBEN, 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 Florestalis**, Piracicaba, n. 58, p.25-40, 2000.

SIGRIST, M.R.; SAZIMA, M. *Ruellia brevifolia* (pohl) *Ezcurra* (Acanthaceae): fenológica da floração, biologia da polinização e reprodução. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, n.1, p.35-42, 2002.

SILVA JUNIOR, M.C. **100 Árvores do Cerrado:** Guia de campo. Brasília, Rede sementes do Cerrado, 2005. 278p.

SLATIKIN, M.A. a measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Bethesda, v. 139, n.1, p.457-462, 1995.

- SOARES, T.N. **Estrutura e padrão espacial da variabilidade genética de *Dipteryx alata* Vogel (Barueiro) no Cerrado**. 2006. 126p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: - Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.
- SOARES, T.N.; CHAVES, L. J.; TELLES, M.P.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; RESENDE, L.V. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genética**. DOI 10.1007/s10709-007-9144-7, 2007. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=17333479&query_hl=4&itool=pubmed_docsum, acesso em: 5 abril 2007.
- SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 17, p.172-192.
- SOLFERINI, V.N.; SCHEEPMAKER, D.S. Polimorfismo de Isoenzimas. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 13, p. 137-142.
- STEARNS, S.C.; HOEKSTRA, R.F. **Evolução**: uma introdução. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 3, 379p.
- SUFFERT, N.R.; LIBANO, A.M.; ROCHA, D.S. Padrão de Floração de uma População de *S.lyocarpum* A. St.-Hil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 57, **Resumo...** Gramado:2006. 1CD-ROM.
- TELLES, M.P.C.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; COELHO, A.S.G.; CHAVES, L.J. Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia desinterica* DC, Myrtaceae) no sudeste de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, p. 145-154, 2001.
- TELLES, M.P.C.; VALVA, F.D.; BANDEIRA, L.F.; COELHO, A.S.G. caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, mar.2003.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 2000. 128 p.

- VALOIS, A.C.C.; VALVA, J.R.; FERREIRA, F.R.; FILHO, W.S.S.; DANTAS, J.L.L. Melhoramento de espécies de propagação vegetativa. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, IL S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos & Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. 2001. 1183p.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O.J. New insights from fine –scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 921-935, 2004.
- VENCOVSKY, R. Variance of an estimative of the outcrossing rate. **Brazilian of journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 349-351, 1994.
- VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Variance effective populations size under mixed self and random mating with application to genetic conservation of species. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1282-1294, out.1999.
- VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, Madison, v. 43, p 1912-1921, 2003.
- VIDAL, M.C.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; CÂMARA, H.H.L.L. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (lobeira) em casa de vegetação. **Acta Botânica Brasileira**, Porto Alegre, v. 13, p. 271-275, 1999.
- VIEIRA, D.L.M.; AQUINO, F.G.; BRITO, M.A.; FERNANDES-BULHÃO, C.; HENRIQUES, R. B. Síndromes de dispersão de espécies arbustivo-arbóreas em cerrado *sensu strictu* do Brasil Central e savanas amazônicas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 215-220, jun.2002.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer associates, 1996. 445p.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics of the analysis of populations structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 1899-1909, 1999.
- ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markes from *Eucaliptus* spp. to *Eugenia dysinterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology**, Oxford, n. 2, p. 512-513, 2002.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)