UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

SISTEMA REPRODUTIVO E FLUXO GÊNICO VIA PÓLEN EM UMA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DE *Eugenia dysenterica* DC.

EDUARDO BORGES RODRIGUES

Orientador(a):
Profª. Dra. Mariana Pires de Campos Telles

Goiânia - GO
Brasil

Março – 2012

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: EDUARDO BORGES RODRIGUES

Título do trabalho: SISTEMA REPRODUTIVO E FLUXO GÊNICO VIA PÓLEN EM UMA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DE *Eugenia dysenterica* DC.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO1

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Eduardo Borges Rodrigues
Assinatura do (a) autor (a) [2]

Data: 18 / 05 / 2017

1 Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

[2]A assinatura deve ser escaneada.

EDUARDO BORGES RODRIGUES

SISTEMA REPRODUTIVO E FLUXO GÊNICO VIA PÓLEN EM UMA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DE *Eugenia dysenterica* DC.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientadora:
Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles

Co-orientadora:
Profa. Dra. Rosane Garcia Collevatti

Goiânia, GO – Brasil
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Borges Rodrigues, Eduardo
Sistema reprodutivo e fluxo gênico via pólen em uma coleção de germoplasma de Eugenia dysenterica DC. [manuscrito] / Eduardo Borges Rodrigues. - 2012.
80 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mariana Pires Campos Telles; co-orientador Dr. Rosane Garcia Collevatti.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Genética & Melhoramentos de Plantas , Goiânia, 2012.
Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Coleção de germoplasma. 2. Eugênia dysenterica. 3. Fluxo gênico via pólen. 4. Sistema reprodutivo. I. Pires Campos Telles, Mariana, orient. II. Título.

CDU 575

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

UFG

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE EDUARDO BORGES RODRIGUES

Aos nove dias do mês de Março do ano de dois mil e doze (09.03.2012), às 14h00min, no Auditório PPGA da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora, Profª. Drª. Mariana Pires de Campos Telles – Presidente/Orientadora; Prof. Dr. Lázaro José Chaves e Profª. Drª. Karina Martins para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada: **"Sistema de cruzamento e fluxo gênico via pólen em uma coleção de germoplasma de *Eugenia dysenterica* DC."**, de autoria de **Eduardo Borges Rodrigues**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, no nível de Mestrado, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Profª. Drª. Mariana Pires de Campos Telles, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Dissertação que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca argüiu mestrando, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu a avaliação da defesa. O título da dissertação foi alterado para "Sistema reprodutivo e fluxo gênico via pólen em uma coleção de germoplasma de Eugenia dysenterica DC.". De acordo com a Resolução nº 1053/2011, do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, e desde que procedidas às correções recomendadas, a Dissertação será considerada aprovada pela Banca Examinadora, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, pela Universidade Federal de Goiás. O mestrando deverá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar a versão definitiva da Dissertação à Secretaria do PGMP, no prazo máximo de trinta dias após a data da Defesa. A conclusão do Curso e a emissão do Diploma dar-se-ão após o cumprimento do Artigo 52 da Resolução CEPEC nº 1053/2011. A Banca Examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa Dissertação, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às ___h___min. A presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Jéssica Almeida, secretária do PGMP, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

Profª. Drª. Mariana Pires de Campos Telles
Presidente/Orientadora

Prof. Dr. Lázaro José Chaves
Membro Interno

Profª. Drª. Karina Martins
Membro Externo

Á Deus, supremo Senhor e Pai, pela inteligência e direção a mim concedidos na realização deste trabalho,

DEDICO

Aos meus pais, João e Luzia, pela compreensão e apoio incondicional em todas as decisões de minha vida, e aos meus irmãos, pelo carinho, incentivo e compreensão,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. Em especial:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado (proc. 557164/2010-9); e pelo apoio financeiro concedido pelo projeto de pesquisa (proc. 475182/2009-0), sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG. A todos os professores que estão realmente envolvidos no crescimento e na qualidade científica do Programa, muito obrigado pelos ensinamentos, exemplo e dedicação.

À minha orientadora, professora Dra. Mariana Pires de Campos Telles, pelos ricos ensinamentos, mas principalmente, pela confiança na minha capacidade até mesmo em momentos em que nem mesmo eu acreditava. Muito obrigado, por me ajudar a enxergar o trabalho científico com outros olhos e amadurecer tanto profissionalmente como pessoalmente!

À minha co-orientadora, professora Dra. Rosane Garcia Collevatti, pelo interesse em conhecer e discutir os resultados da dissertação, mas principalmente, pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos professores Lázaro José e Karina Martins por terem aceitado o convite para participarem da Banca Examinadora da dissertação.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética & Biodiversidade pela amizade, companheirismo, auxílio nos experimentos, resumos, análises de dados e também pelos momentos de descontração compartilhados ao longo desses dois anos. Agradeço imensamente aos colegas Edivaldo Barbosa, Ana Clara e Jaqueline Silva pela amizade e ajuda na discussão dos resultados e na análise de dados.

À minha família por todo carinho e confiança que tem por mim. Aos meus queridos pais, irmãos e sobrinhos pelo amor e compreensão pelas minhas constantes ausências física em função da realização desse trabalho.

A todos o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO..... 8
ABSTRACT..... 9

1 INTRODUÇÃO..... 10

2 REFERENCIAL TEÓRICO..... 13
2.1 CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS..... 13
2.2 COLECÕES DE GERMOPLASMA..... 16
2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS COLEÇÕES DE GERMOPLASMA..... 18
2.3.1 **Descritores morfo-agronômicos**..... 19
2.3.2 **Marcadores moleculares no manejo de germoplasma**..... 20
2.4 SISTEMA REPRODUTIVO..... 25
2.5 FLUXO GÊNICO EM ESPÉCIES VEGETAIS..... 28
2.6 A ESPÉCIE *Eugenia dysenterica* DC..... 31

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 37
3.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA..... 37
3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO..... 38
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE NOS LOCOS MICROSSATÉLITES..... 40
3.4 AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTIVO..... 41
3.5 ANÁLISE DE PATERNIDADE E DISTÂNCIA DE DISPERSÃO DE PÓLEN..... 43

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 45
4.1 VARIABILIDADE GENÉTICA PRESERVADA NA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA 45
4.2 SISTEMA REPRODUTIVO..... 50
4.2.1 **Frequências alélicas nos óvulos e pólen**..... 50
4.2.2 **Taxas de cruzamento**..... 53
4.2.3 **Parentesco e tamanho efetivo de variância**..... 55
4.3 ANÁLISE DE PATERNIDADE E DISTÂNCIA DE DISPERSÃO DE PÓLEN..... 57
4.4 IMPLICAÇÕES PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DA ESPÉCIE 65

5 CONCLUSÕES..... 66

6 REFERÊNCIAS..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Localidades amostradas e coordenadas geográficas das populações de *Eugenia dysenterica* na região sudeste do Estado de Goiás, 1996..... 37

Tabela 2 Relação dos pares de iniciadores de regiões microssatélites utilizados e suas características, em que *AVA* refere-se à variação da amplitude alélica de cada loco microssatélite e *Ta* a temperatura de anelamento do iniciador..... 39

Tabela 3 Caracterização da variabilidade genética em locos microssatélites de indivíduos da coleção de germoplasma de *E. dysenterica*. Sendo que, *A* representa o número de alelos; *AM* a amplitude alélica; *He* a heterosigozidade esperada; *Ho* a heterosigozidade observada; *Q* indica à probabilidade de exclusão de paternidade e *I* a probabilidade de identidade genética..... 46

Tabela 4 Divergência genética ($\hat{F}_{ST}$) entre as frequências alélicas do pólen e dos óvulos nas progênies de *E. dysenterica*..... 51

Tabela 5 Taxa individual de cruzamento multiloco e uniloco por família..... 53

Tabela 6 Parâmetros de endogamia e sistema reprodutivo em *E. dysenterica*..... 54

Tabela 7 Resultado do teste de paternidade realizado na coleção de germoplasma de *E. dysenterica*..... 57

Tabela 8 Resultados dos testes de atribuição de paternidade para 542 sementes descendentes dos indivíduos da coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, para diferentes níveis de confiança 61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Modelos de fluxo gênico. a) Modelo continente-ilha; b) Modelo de ilhas; c) Modelo "*stepping stone*"; d) Modelo de Isolamento por Distância (Fonte: (Zucchi, 2002)..... 30

Figura 2 *Eugenia dysenterica* DC. A) ramos com frutos verdes e maduros; B) ramos com flores; C) indivíduos adultos da coleção de germoplasma *in vivo* da Universidade Federal de Goiás (Fonte: o autor)..... 32

Figura 3 Distribuição natural de *Eugenia dysenterica* em 110 localidades entre 376 levantamentos realizados no Bioma Cerrado (Fonte: (Ratter et al., 2000)..... 32

Figura 4 Esquema experimental da coleção de germoplasma de *Eugenia dysenterica DC.* mantida em uma estação experimental pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG), em Goiânia-GO. Os círculos representam as árvores matrizes..... 38

Figura 5 Perfil eletroforético de marcadores microssatélites utilizando iniciadores transferidos de *Eucalyptus* ssp. para *E. dysenterica*..... 45

Figura 6 Perfil eletroforético de marcadores microssatélites utilizando iniciadores desenvolvidos para *E. dysenterica*..... 46

Figura 7 Distribuição das frequências alélicas encontradas para os quatro locos microssatélites desenvolvidos para *E. dysenterica*. As barras azuis representam as frequências alélicas dos indivíduos adultos da coleção de germoplasma, as vermelhas representam as frequências nas progênies..... 48

Figura 8 Distribuição das frequências alélicas encontradas para os quatro locos microssatélites desenvolvidos para *Eucalyptus* spp. e transferidos para *E. dysenterica*. As barras azuis representam as frequências alélicas dos indivíduos adultos da coleção de germoplasma, as vermelhas representam as frequências nas progênies..... 49

Figura 9 Distribuição de frequência das distâncias de dispersão de pólen na coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, para doadores de pólen atribuídos com 95% de confiança..... 62

Figura 10 Distribuição de frequência das distâncias de dispersão de pólen na coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, para doadores de pólen atribuídos com 99% de confiança..... 62

Figura 11 Dispersão de pólen dentro da coleção de germoplasma. Os círculos abertos representam as 23 matrizes; a espessura do traço indica a frequência dos eventos de polinização do doador de pólen; e a as setas as matrizes representadas..... 64

RESUMO

RODRIGUES, E. B. **Sistema reprodutivo e fluxo gênico via pólen em uma coleção de germoplasma de *Eugenia dysenterica* DC.** 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.[1]

A definição de qualquer programa de melhoramento ou de conservação de recursos genéticos depende, inicialmente, do conhecimento do fluxo gênico, do sistema reprodutivo e da variabilidade genética existente nas populações. Nesse sentido, as coleções de germoplasma podem funcionar como um método de conservação *in vivo* e *ex situ*, em que amostras da variabilidade genética de determinada espécie é conservada fora do habitat da espécie. O objetivo geral desse estudo foi avaliar o fluxo via pólen de uma geração, o sistema reprodutivo e caracterizar molecularmente os indivíduos que compõem a coleção de germoplasma *in vivo* e e*x situ* de *Eugenia dysenterica* DC., mantida pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás. Para tanto, foram coletadas folhas das 404 árvores e frutos de 23 árvores (matrizes) que compõem a coleção de germoplasma. Para a obtenção dos genótipos das árvores e das progênies foram utilizados oito locos microssatélites, quatro desenvolvidos para espécie e os outros quatro desenvolvidos para *Eucalyptus* ssp. e transferidos para *E. dysenterica.* Com base nos genótipos foram realizadas as análises descritivas de variabilidade genética, testes de paternidade, distância de dispersão de pólen e taxa de fecundação cruzada para todas as progênies. Para os oito locos analisados, o número de alelos foi igual a 88, variando entre 4 e 20 com uma média igual a 11 alelos por loco. Os valores médios de heterosigozidade esperada (*He*) e observada (*Ho*) foram iguais a 0,646 e 0,423. Avaliada a variabilidade genética nas duas gerações foi possível concluir que a coleção de germoplasma de *E. dysenterica* está preservando bem a diversidade genética oriunda das populações naturais da região sudeste do Estado de Goiás. Adicionalmente, a probabilidade de exclusão combinada (*QC*) foi igual a 0,99579 e a probabilidade de identidade combinada (*IC*) foi igual a $7{,}9\text{x}10^{-5}$. As taxas de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$) e uniloco ($\hat{t}_s$) foram altas e iguais a 0,957 e 0,848, respectivamente. A diferença da taxa de cruzamento multiloco e uniloco $(t_m - t_s)$ combinada para todas as famílias analisadas também foi positiva e significativa, indicando a ocorrência de 10,9% $(t_m - t_s = 0{,}109)$ de fecundação cruzada entre indivíduos aparentados. A correlação de paternidade foi baixa $\left(\hat{r}_p = 0{,}119\right)$ sugerindo que 11,9% dos indivíduos das progênies são filhos do mesmo doador de pólen. Em média 10,79% das progênies analisadas foram originadas por cruzamentos biparentais, sendo aparentados no grau de irmãos germanos, 84,70% foi formada por cruzamentos, sendo aparentados no grau de meios-irmãos e somente 4,6% das sementes foram formadas por autofecundação. Na análise de paternidade, apenas 32% (171) das sementes tiveram seus doadores de pólen atribuídos para um nível de confiança de 95%, o que pode ser explicado por três fatores: a presença de indivíduos juvenis não amostrados; a presença de outros indivíduos de *E. dysenterica* em outras estações experimentais próximas a coleção de germoplasma; ou pela bateria de locos, que não apresentou os valores considerados ótimos para a probabilidade de exclusão combinada. O efeito da floração "*big-bang*" e a distribuiçao agregada dos indivíduos adultos torna predominante os eventos de fecundação cruzada em curtas distâncias na coleção de germoplasma de *E. dysenterica.* O alcance máximo de dispersão de pólen foi de 224 m, esse valor abrange quase toda a área experimental da coleção de germoplasma.

Palavras-chaves: coleção de germoplasma, *Eugenia dysenterica*, fluxo gênico via pólen, sistema reprodutivo

---

[1] Orientadora: Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles. ICB-UFG
Co-orientadora: Profa. Dra. Rosane Garcia Collevatti. ICB-UFG

ABSTRACT

RODRIGUES, E. B. **Mating system and pollen-mediated gene flow in a germplasm collection of *Eugenia dysenterica* DC.** 2012. 80f. Dissertation (Master in Genetic and Plant Breeding) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.[1]

The success of any breeding program or genetic resources conservation depends on the knowledge about gene flow, reproductive system and genetic variability in the studied populations. For perennial plants, germplasm collection maintained *'in vivo'* and *'ex situ'* can be an efficient method for conserving the genetic variability of a species is maintained outside its original habitat. This study aimed to evaluate the reproductive system and pollen-mediated gene flow in one generation of *Eugenia dysenterica* DC. from the germoplasma collection of the Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos from Universidade Federal de Goiás. We collected leaves from 404 adult plants and seeds from 23 mother-trees in the germplasm collection. Genotypes were obtained using eight microsatellite loci, four of them developed for *E. dysenterica*, and four transferred from *Eucalyptus* spp. The total number of alleles was 88, ranging from 4 to 20 for the eight loci analyzed (mean of 11 alleles per locus). The mean expected (*He*) and observed (*Ho*) heterozygosity were equal to 0.646 and 0.423, respectively. Additionally, the high combined paternity exclusion probability (*QC*= 0.99579), and the low combined probability of identity (*IC* = 7.9 x10^{-5}) indicate that markers can be reliable for this kind of analysis. Multilocus outcrossing rates ($\hat{t}_m = 0.957$) and single locus outcrossing rates ($\hat{t}_s = 0.848$) were high. Biparental inbreeding ($t_m - t_s = 0{,}109$)) combined for all families analyzed was also high and significant, sugesting the occurrence of 10.9% of cross-fertilization between related individuals. Paternity correlation was also low ($\hat{r}_p = 0{,}119$), with 11.9% of the progeny sired by cross-fertilization with the same pollen donor. On average 10.79% of the progeny analyzed were derived by biparental cross, whereas 84.70% were formed by multi-parental crosses, being related to the degree of half-sibs. Only 4.6% of the seeds were formed by selfing. Paternity was successfully assigned with 95% of confidence to 32% (171) of the seeds analyzed, most likely due to non-sampled candidate pollen donors or because the loci battery could not demonstrated the optimal values for the combined exclusion. The maximum pollen dispersal distance (224 m) corresponded to the length of the orchard. The "big-bang" flowering pattern and the aggregated spatial distribution of adults may have favored short distance pollen dispersal at the germplasm collection of *E. dysenterica*. Our results show that the *E. dysenterica* germplasm collection preserves the genetic diversity present in natural populations of southeastern Goiás and can be a reliable approach for maintenance of genetic diversity of the species for the future.

Keywords: pollen dispersal, *in situ* conservation, Cerrado, pollen-mediated gene flow, mating system

[1] Adviser: Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles. ICB-UFG
Co-adviser: Profa. Dra. Rosane Garcia Collevatti. ICB-UFG

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países de maior biodiversidade no mundo, calcula-se que nada menos de 10% de toda a biota terrestre encontram-se no país (Mittermeier et al., 1998; Myers et al., 2000) Devido às suas dimensões continentais, o Brasil reúne uma grande diversidade florística, que se encontra distribuída pelos mais diferentes ecossistemas (Klink & Machado, 2005). Embora as estimativas de riqueza variem enormemente, o universo das espécies vegetais conhecidas para os principais grupos taxonômicos já é suficiente para colocar o país no primeiro lugar mundial em termos de espécies. Além do tamanho, o isolamento geográfico observado no passado remoto e a grande variação de ecossistemas seriam as razões que explicam tal biodiversidade (Machado et al., 2004).

Dentro da grande diversidade vegetal, as espécies frutíferas do Cerrado destacam-se pelo seu elevado valor econômico. Além disso, muitas dessas frutas são importantes fontes de alimento e de sustento para as populações de baixa renda em várias partes do país (Silva-Junior, 2004). Para Naves (1999) várias dessas espécies frutíferas estão ameaçadas e, portanto, merecem lugar de destaque em estudos de conservação e manejo sustentável.

A maioria das espécies frutíferas nativas do Cerrado encontra-se em estado selvagem, e apresentam enorme variabilidade genética em diversos caracteres (Chaves, 2002). Apesar de sua grande importância como alternativa econômica para o aproveitamento sustentado da região, poucas informações estão disponíveis sobre estas espécies e, além disso, muitas delas apresentam forte tendência ao desaparecimento, devido à exploração irracional do ecossistema em que ocorrem (Almeida & Sano, 1998). Myers et al. (2000) acreditam que a presença destas espécies, muitas endêmicas, em um ecossistema altamente ameaçado como o Cerrado, reforça a necessidade de estudos para sua conservação em particular, bem como do bioma como um todo.

A definição de um programa de conservação de recursos genéticos que venha efetivamente dar condições para a manutenção de uma espécie nativa depende,

inicialmente, do conhecimento do fluxo gênico, do sistema reprodutivo e da diversidade entre populações (Clement, 2001). Assim, a conservação dos recursos genéticos vegetais de uma espécie a partir do conhecimento dessas características, visa a manutenção da variabilidade genética de interesse atual e de potencial para o homem. Nesse sentido, as coleções de germoplasma servem ao duplo propósito de prover material para o melhoramento no presente e conservar a diversidade genética para o futuro (Nass, 2001; Vallois et al., 2001). As coleções de germoplasma podem funcionar como um método de conservação *in vivo* e *ex situ*, em que amostras da variabilidade genética de determinada espécie pode ser conservada fora do seu habitat natural (Yorinori & Kiihl, 2001; Nass, 2001; Scariot & Sevilha, 2007).

Grande parte das espécies frutíferas nativas que apresentam potencial de utilização econômica pertence à família Myrtaceae, incluindo dezenas de espécies endêmicas do Cerrado brasileiro (Proença & Gibbs, 1994). No entanto, embora as espécies da família Myrtaceae apresentem um grande potencial de utilização na fruticultura nacional, Gressler et al. (2006) relatam que os estudos destas espécies, tanto básicos quanto aplicados, são ainda incipientes.

Dentre as diversas frutíferas da família Myrtaceae que apresentam potencial de utilização em sistemas tradicionais de produção agrícola, a *Eugenia dysenterica* DC. (cagaiteira) merece destaque pelo seu amplo potencial econômico (Almeida & Sano, 1998). Além do consumo *in natura*, são inúmeras as receitas de doces e bebidas que levam o sabor de sua polpa (Chaves & Telles, 2006). Esse aproveitamento é bastante difundido entre os habitantes do Cerrado, podendo ser encontrados, inúmeros pratos típicos da região, com destaque para os doces, geleias, licores, sorvetes e sucos (Almeida & Sano, 1998; Naves, 1999).

Neste contexto, é indispensável a implantação, manutenção, conservação, caracterização, avaliação e utilização das coleções de germoplasma de *Eugenia dysenterica* DC. com o objetivo de preservar a espécie da degradação do ambiente em que se encontra e fornecer suporte para o manejo sustentável da espécie. Os marcadores microssatélites podem ser considerados descritores moleculares ideais para a estimação de parâmetros genéticos de populações mantidas em coleções de germoplasma. Esse tipo de marcador é útil para a compreensão da diversidade genética neutra e dos padrões de fluxo gênico e parentesco, bem como a elucidação do sistema reprodutivo de uma espécie (Goldstein & Scholotter, 1999; Scholotterer, 2000). São marcadores moleculares abundantes e

uniformemente distribuídos pelo genoma de plantas, além de serem co-dominantes, multialélicos e com alta heterosigozidade (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Faleiro, 2007).

Em decorrência das informações moleculares complementarem as informações ecológicas, morfológicas e agronômicas dos recursos genéticos, este trabalho teve por objetivo geral caracterizar geneticamente os indivíduos que compõem a coleção de germoplasma *in vivo* e e*x situ* de *Eugenia dysenterica* DC., mantida pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, além de avaliar o sistema de cruzamento e o fluxo gênico contemporâneo de uma geração.

Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

i. Estimar a diversidade genética preservada nos indivíduos da coleção de germoplasma, por meio de marcadores microssatélites;
ii. Estimar o parentesco entre os indivíduos das progênies oriundas da coleção de germoplasma;
iii. Avaliar as taxas de autofecundação e fecundação cruzada em uma estação reprodutiva dos indivíduos da coleção de germoplasma;
iv. Determinar a distância de dispersão de pólen na coleção de germoplasma;
v. Determinar o tamanho efetivo de variância na coleção de germoplasma, bem como a área efetiva média de vizinhança de polinização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

A biodiversidade ou diversidade biológica é representada por todas as espécies de plantas, animais e microorganismos, em interação com os ecossistemas e os processos ecológicos do quais essas espécies fazem parte (Mittermeier et al., 1998). Goedert (2007) divide a biodiversidade em três níveis: diversidade genética que consiste na informação contida nos genes dos indivíduos; diversidade de espécies, que se refere à diversidade de organismos vivos na Terra; e diversidade de ecossistemas, que corresponde à variedade de hábitats, comunidades biológicas e processos ecológicos.

Apesar do aumento do conhecimento científico em diversidade biológica ser evidente nos últimos anos, vários ecossistemas brasileiros ainda sofrem degradação contínua (Durigan et al., 2006). De acordo com Costa (2004), da área inicial do Cerrado, de cerca de dois milhões de km^2, aproximadamente dois terços foram profundamente alterados pela ação humana. A ação humana direta ou indireta tem destruído a diversidade biológica em proporções comparadas às cinco extinções em massa reveladas pelo registro fóssil, o que faz com que seja considerada a sexta extinção em massa da história evolutiva (Frankham et al., 2008).

No sentido de conservar a biodiversidade dos trópicos, nas últimas décadas aumentou-se a percepção da necessidade de preservar as espécies animais e vegetais do Cerrado ameaçados de extinção, com especial atenção àquelas com potencial econômico, como as frutíferas. Para tanto, várias pesquisas são conduzidas para conhecer melhor as espécies sob os aspectos genético, ecológico, fisiológico, e ainda, preservar os recursos genéticos (Costa, 2004).

Os recursos genéticos são uma parte bastante importante dessa biodiversidade e são definidos pelo Decreto Legislativo nº. 2.519, de 16 de março de 1998, como o material genético de valor real ou potencial usado pelo homem para a promoção do

desenvolvimento sustentável. Neste contexto, os recursos genéticos vegetais compreendem plantas cultivadas e espécies silvestres com valor comprovado ou mesmo com elevado potencial agrícola, industrial ou medicinal que precisam ser urgentemente mantidos (Walter & Cavalcanti, 2005).

Goedert (2007) acrescenta que, os recursos genéticos tratam da variabilidade genética entre as espécies (variabilidade interespecífica) de grupos de plantas de interesse para as suas regiões de origem. Nesse caso, diz-se recursos genéticos de frutíferas do Cerrado, recursos genéticos de forrageiras dos Campos Sulinos. Adicionalmente, o elemento dos recursos genéticos que maneja a variabilidade dentro de cada espécie (variabilidade intraespecífica), com fins de utilização em programas de melhoramento e em biotecnologia, denomina-se germoplasma. Diz-se, portanto, germoplasma de citros, cagaiteira, mangaba, etc. Segundo Vencovsky et al. (2007), o germoplasma representa um aglomerado de fatores genéticos organizados de sorte a dar a populações de plantas e seus indivíduos as condições necessárias para sua sobrevivência em seu meio ambiente.

No contexto conservacionista e de manejo da diversidade biológica, há duas estratégias de conservação dos recursos genéticos vegetais que são complementares, a conservação de coleções *in situ* e *ex situ* (Nass, 2001; Rao, 2004). A escolha da estratégia depende de aspectos relacionados à espécie, dos objetivos e prioridades do programa de manejo. A conservação *in situ* consiste na manutenção e recuperação de recursos genéticos nos seus habitats naturais (Rao, 2004; Scariot & Sevilha, 2007). Já a conservação *ex situ* é a manutenção do germoplasma fora de seu habitat natural, sem riscos de alterações na sua composição genética (Karp et al., 1997; Vallois et al., 2001).

A essência da conservação *in situ* está na conservação do germoplasma na localidade em que é encontrado, seja em seus locais de origem ou onde desenvolveu suas características distintas (Scariot & Sevilha, 2007). Neste contexto, não estão incluídas aquelas situações em que o germoplasma foi transportado para uma localidade distante com o objetivo de facilitar a conservação.

Para populações naturais, especialmente de espécies ameaçadas, a conservação *in situ* é apontada como a mais apropriada (Nass, 2001; Chaves, 2002). Neste caso, a conservação se daria em reservas genéticas, especialmente criadas para este fim, levando-se em consideração a possibilidade de se manter a dinâmica das populações naturais, com o mínimo de erosão genética e, em consequência, a continuidade dos processos evolutivos que originam e mantêm a biodiversidade (Naves, 1999; Chaves, 2002). No Brasil, a

conservação *in situ* é realizada segundo dois modelos: unidades de conservação de uso indireto e de uso direto. A primeira destina-se à conservação da biodiversidade, à pesquisa científica, à educação ambiental e à recreação. Nessas unidades não se permite a exploração dos recursos naturais, podendo-se apenas usufruir indiretamente dos seus benefícios. Essas unidades incluem as reservas biológicas, os parques nacionais, áreas de interesse ecológico, as reservas particulares do patrimônio nacional e as áreas sob proteção especial. A segunda destina-se à conservação da biodiversidade, porém é permitido o uso de seus recursos naturais de forma sustentável. Essa categoria inclui as florestas nacionais, as áreas de proteção ambiental e as reservas extrativistas (Nass, 2001).

Embora a conservação *in situ* seja a estratégia mais adequada par populações naturais, esta deve ser completada pela conservação *ex situ* (Telles et al., 2001). Neste caso devem-se priorizar as áreas de maior risco de erosão genética por alterações antrópicas, coletando amostras para a conservação em bancos de germoplasma ou coleções *in vivo*. A conservação *ex situ* é uma estratégia preconizada para manter, em longo prazo e com máxima integridade genética e biológica, os genótipos de espécies fora de seu ambiente natural (Santos & Salomão, 2007).

A conservação *ex situ* de recursos genéticos inclui conservação de sementes, de material vegetativo *in vivo*, de DNA, de pólen e de coleções a campo. Santos & Salomão (2007) sugerem que as frutíferas do cerrado sejam mantidas em germoplasma em coleções a campo *in vivo*, em que a espécie pode responder às intempéries ambientais e aos estresses bióticos e abióticos. Na medida do possível, esta conservação é feita sob condições de armazenamento que propiciem o aumento do período de sobrevivência e garantam a estabilidade genética do material conservado. A necessidade da conservação *ex situ* geralmente é motivada pela ação antrópica e pela destruição do habitat natural, como o que tem ocorrido com as florestas tropicais, cerrados, mangues e outros biomas hoje em processo de degradação, onde ocorrem espécies de uso atual (via extrativismo) e potencial, além de parentes silvestres de espécies cultivadas (Nass, 2001). Nas coleções de germoplasma os recursos genéticos da espécie são armazenados para a manutenção da variabilidade genética visando à utilização em programas de melhoramento e conservação.

2.2 COLEÇÕES DE GERMOPLASMA

A contribuição e o pioneirismo dos trabalhos realizados pelo botânico russo Nikolai Vavilov, no início do século XX, representaram um marco inicial para os estudos de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais. Vavilov foi o primeiro a compreender a importância e os benefícios potenciais a serem alcançados com as coletas de germoplasma ao redor do mundo e pela organização dessas amostras em forma de coleção. Esses esforços iniciais foram essenciais para a estruturação das coleções de germoplasma em todo o mundo (Nass, 2001).

As coleções de germoplasma são os locais em que se estocam, em condições adequadas, amostras de genótipos que representam parte da variabilidade genética de uma espécie objeto da conservação ou do manejo sustentado (Nass, 2001). Desse modo, o objetivo principal das coleções de germoplasma é o de preservar a variabilidade genética existente para determinada espécie em um ambiente controlado, sendo por este motivo considerado um método de conservação *ex situ*.

O desenvolvimento das coleções de germoplasma é resultado de uma preocupação constante entre os profissionais envolvidos na conservação e melhoramento de plantas, que é a erosão genética ou perda de alelos (Sigrist, 2009). A perda de alelos diminui a variabilidade genética disponível, tornando o processo de seleção menos eficaz. Além disso, uma baixa variabilidade implica em uma maior vulnerabilidade a pragas, doenças e condições adversas (Yorinori & Kiihl, 2001).

As coleções de germoplasma têm sido mantidas em diversas instituições que têm por responsabilidade: i) garantir a sua diversidade genética (seja pela iniciativa de coletar periodicamente recursos genéticos, seja por favorecer o intercâmbio com outras coleções de germoplasma); ii) multiplicá-las; iii) distribuí-las aos usuários e, iv) promover a sua caracterização por diferentes metodologias. Segundo Vasconcelos et al. (2007), cerca de 6,1 milhões de acessos de plantas são conservados em todo o mundo e esses acessos encontram-se dispostos em 1.320 coleções de germoplasma. Essas coleções encontram-se distribuídas pelos 157 países que compõem a Comissão de Recursos Fitogenéticos da FAO. No Brasil, existem mais de 200 mil acessos de plantas conservados *ex situ*, em cerca de 160 coleções de germoplasma implantados em mais de 50 locais (Scariot & Servilha, 2007).

As coleções de germoplasma podem ser caracterizadas como: coleções de base, ativa, nuclear, de trabalho, coleção *in vitro*, a campo, em criopreservação e banco genômico. A coleção de base agrupa toda a variabilidade possível da espécie-alvo, incluindo parentais selvagens, cultivares, variedades crioulas e elites. A coleção de base tem a finalidade de conservação do germoplasma em longo prazo. Nesse sentido há preocupação com possíveis perdas de material e não com a distribuição. Nessa coleção são armazenadas sementes em condições de baixa umidade e temperatura. A coleção ativa faz a conservação a curto e médio prazo, com a finalidade de gestão e distribuição do germoplasma. Nestes locais são mantidas amostras provenientes da coleção de base, mas a preocupação é com a avaliação, documentação e intercâmbio do material. A coleção nuclear, por sua vez, reúne a maior variabilidade genética de uma espécie no menor número possível de amostras. Os acessos duplicados são eliminados, o que reduz as amostras similares. Esse tipo de coleção tem a finalidade de facilitar a gestão e subsidiar a utilização do germoplasma. A coleção de trabalho é aquela que fornece o material para o melhorista ou para instituições de pesquisa que fazem melhoramento. As sementes são conservadas em curto prazo, o tamanho costuma ser limitado e é composto por germoplasma elite. Na coleção *in vitro* os materiais disponíveis são células, órgãos e tecidos vegetais em meios de cultura que podem ser regenerados e aclimatados. Na conservação a campo as sementes são germinadas e a planta é mantida. Essa estratégia é adotada para espécies de propagação vegetativa, ou que apresentam sementes recalcitrantes. Na criopreservação o germoplasma é mantido em nitrogênio líquido a -196 ºC, ou em sua fase de vapor a -150 ºC. Esse tipo de estratégia é adotada para conservação de embriões e pólen de espécies que produzem sementes sensíveis a dessecação. O banco genômico, por sua vez, consiste na preservação de DNA (Valois, 1996; Santos & Salomão, 2007).

Embora os recursos genéticos sejam a base para o melhoramento, a variabilidade genética disponível nos acessos preservados nas coleções de germoplasma permanece pouco explorada. Vasconcelos et al. (2007) acreditam que apenas cerca de 4% de todos os acessos são utilizados no mundo. Entre as principais causas desta baixa utilização estão a falta de documentação, descrição e avaliação adequada dos materiais com informações desejadas pelos melhoristas (Nass, 2001). Portanto, fica clara a importância estratégica de atividades relacionadas à caracterização do germoplasma, principalmente no sentido de incentivar a utilização destes recursos em programas de melhoramento e manejo.

Portanto, a eficiência e o sucesso de qualquer programa de conservação *in situ* ou *ex situ* e melhoramento genético vegetal passam primeiro pela caracterização e

avaliação das coleções de germoplasma, que possibilita estimar a diversidade genética presente nos acessos do germoplasma (Vallois et al., 2001; Telles et al., 2003). Essa caracterização pode ser morfo-agronômica, citológica, bioquímica, fisiológica ou molecular. Independente do método empregado, o importante é que os resultados possibilitem boa distinção dos acessos, permitam identificar duplicatas e também acessos com características relevantes para diversos programas de melhoramento (Conti et al.. 2002).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS COLEÇÕES DE GERMOPLASMA

A importância da caracterização do germoplasma para os programas de melhoramento e conservação da diversidade genética possibilita a quantificação e a utilização da variabilidade genética conservada de modo eficiente e sustentável. Portanto, caracterizar uma coleção de germoplasma significa basicamente, identificar e descrever as diferenças entre os acessos (Vallois et al., 2001; Walter & Cavalcanti, 2005). Em termos genéticos, refere-se à detecção da variação resultante de diferenças em sequências de DNA ou genes específicos (Vicente et al., 2005).

Em plantas perenes, essa atividade desempenha papel preponderante por eliminar duplicatas, reduzir gastos consideráveis na manutenção, quantificar a diversidade, otimizar estratégias de amostragens, pelo conhecimento dos níveis de estruturação genética, além de identificar acessos desejáveis para programas de melhoramento genético. Em consequência disso, órgãos de pesquisas detentores de germoplasma desse grupo de plantas vêm envidando esforços para viabilizar estudos dessa natureza (Karp et al., 1997).

A caracterização de germoplasma pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo desde práticas tradicionais, que envolvem o uso de lista de descritores morfológicos e agronômicos, a aplicações bioquímicas para detectar diferenças entre isoenzimas, proteínas e marcadores moleculares (Vicente et al., 2005).

Nas coleções de germoplasma a caracterização tem sido feita tradicionalmente, com a utilização de descritores botânicos, morfológicos e agronômicos, os quais podem ser obtidos por mensuração (quantitativos) ou por observação (qualitativos). Neste tipo de caracterização, tem sido frequente o emprego de estatísticas univariadas para quantificar a diversidade, mas esta metodologia tem baixa precisão no aproveitamento dos dados, devido à interação genótipos x ambientes (Borem & Caixeta, 2009). Por este motivo, em

algumas instituições, essa atividade vem sendo complementada pela aplicação de marcadores moleculares, que fornecem um estudo direto do genótipo por detectar diferenças no nível do DNA.

Para Dias (2007), a caracterização por meio de marcadores moleculares, combinada à obtida por descritores morfológicos e agronômicos, parece mais apropriada para estudo de diversidade em coleções de germoplasma. Mesmo assim, em alguns casos, podem ocorrer discrepâncias, sugerindo que padrões evolutivos morfológicos e moleculares são distintos.

2.3.1 Descritores morfo-agronômicos

A caracterização morfo-agronômica tem sido efetuada em coleções de germoplasma para gerar informações sobre a descrição e a classificação do material conservado, na discriminação de caracteres mais importantes e, principalmente, para subsidiar programas de melhoramento genético por identificar indivíduos desejáveis e quantificar a diversidade disponível (Leão, 2008).

Na maioria das coleções é de praxe a obtenção de dados morfológicos e agronômicos concomitantemente, o que explica a fusão dos nomes. Em plantas perenes, os caracteres podem ser obtidos em diferentes estádios (germinação, juvenil e adulto), grupos (vegetativo, reprodutivo, produtivo) e modos, ou seja, por observações, registradas em escalas de notas (qualitativos), e ou por mensurações (quantitativos). A obtenção de descritores em várias etapas é feita com o objetivo de identificar caracteres que possam ser úteis na seleção precoce. Dessa forma, têm sido comuns a observação e ou mensuração de vários caracteres em um mesmo genótipo (Cury, 1993).

Nas coleções de germoplasma, o termo descritor é utilizado para se referir a um atributo ou caráter que se observa ou se mensura nos acessos, com o objetivo de discriminar um acesso de outro. Nesses locais, frequentemente, há um grande número de acessos que necessita ser caracterizado e avaliado, além de ser regra geral a observação e a mensuração de um grande número de caracteres (Querol, 1993).

Em muitos casos, os caracteres são obtidos sem um critério da sua real contribuição para a variabilidade e esse tipo de procedimento, além de produzir a duplicação da mesma informação para muitos caracteres, tem contribuído para uma análise multivariada confusa e de difícil interpretação. No geral, todo caráter deve apresentar uma

parcela de contribuição na variação do germoplasma analisado. Mas, há uma tendência de que o aumento do número de descritores avaliados ocasione a presença de caracteres redundantes, estando esses caracteres quase sempre associados a outros. Logo, a eliminação dos redundantes seria uma decisão vantajosa, pois reduziria o trabalho de tomada de dados sem ocasionar perda na precisão da caracterização, especialmente se esses caracteres forem de difícil mensuração e apresentarem baixa variabilidade e estabilidade de expressão (Leão, 2008).

2.3.2 Marcadores moleculares no manejo de germoplasma

A habilidade para identificar a variação genética é indispensável para o manejo eficiente e o uso dos recursos genéticos. A dificuldade em utilizar caracteres morfológicos deve-se ao fato de que a grande maioria dos caracteres vegetais são influenciados por fatores ambientais, exibindo variação contínua e um alto grau de plasticidade fenotípica. Na tentativa de solucionar esse problema, marcadores moleculares passaram a serem utilizadas para monitorar a variabilidade genética (Zucchi et al., 2003; Faleiro, 2007).

Estudos na área de biologia molecular a partir da década de 1960 abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para estudos de biologia populacional como um todo. Pela primeira vez a variação encontrada em plantas ou animais pôde ser analisada em nível molecular. Diferenças na sequência gênica podem ser observadas e descritas com um elevado grau de precisão (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores moleculares são uma dessas técnicas em biologia molecular, amplamente utilizados em estudos populacionais.

Borém e Caixeta (2009) relatam o uso do termo marcador para designar fatores morfológicos, fisiológicos ou genéticos passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e de suas progênies. Os primeiros marcadores moleculares a surgirem na década de 1960, foram as isoenzimas. As isoenzimas são baseadas na análise do produto da expressão de genes (Leoi, 2003).

No entanto, as isoenzimas não detectam a variabilidade existente diretamente da molécula de DNA. Somente com o desenvolvimento das técnicas moleculares é que o DNA passou a ser o ponto final no desenvolvimento de novos marcadores (Alfenas, 1998). Para Griffiths et al. (2006), os distintos tipos de marcadores moleculares que surgiram após

as isoenzimas diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade no DNA, pelo polimorfismo molecular, expressão genética, distribuição no genoma, custo e operação.

Os primeiros marcadores moleculares a detectar a variabilidade diretamente na molécula do DNA baseiam-se na ação de enzimas de restrição (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism)* (Boistein et al., 1990) entende-se, em uma tradução literal, o polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA. Tal polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e na hibridização desses fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. Os fragmentos de DNA podem, então, ser separados segundo seu comprimento por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos separados são transferidos para um suporte sólido (membrana de nitrocelulose) e hibridizados com sondas, que são fragmentos de DNA de sequência única marcados por radioatividade. O fragmento de DNA que se hibridizar com a sonda pode, então, ser visualizado na auto-radiografia e revelado como uma banda no filme. A grande vantagem dos marcadores RFLP é sua ampla distribuição no genoma, além de ter expressão co-dominante e alta estabilidade. No entanto, esse tipo de marcador detecta poucos alelos por locus, requer muita quantidade de DNA e no caso do uso de fósforo-32, instalações adequadas ao manuseio e objeto de material radioativo (Faleiro, 2007).

Os Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Jeffreys et al., 1985) são sequências adjacentes que se repetem em número variável, lado a lado. Possuem de 15 a 100 pares de bases e, em cada loco hipervariável, são repetidas até 50 vezes. O nome minissatélite decorre do fato de sequências repetitivas formarem um pico genômico na separação do DNA em gradientes de cloreto de césio, por conter em uma proporção de pares de base G-C diferente do resto do genoma. Os minissatélites estão dispersos por todo o genoma, e perfazem uma proporção detectável do mesmo, constituindo-se em vários locos em diferentes cromossomos (Goldfarb, 1986; Amar & Amar, 1991).

Com o advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida por Kary Mullis nos anos de 1980, apresentou-se uma nova opção ao uso de marcadores moleculares (Mullis & Faloona, 1987). Tal método permite a amplificação *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, usando-se dois oligonucleotídeos

que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Borem & Caixeta, 2009). Nesse grupo incluem-se os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) (Paran & Michelmore, 1993); Microssatélites (Litt & Luty, 1989); e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995).

O RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) surgiu na década de 1990. Esse marcador molecular utiliza como primer ou iniciador oligonucleotídeos curtos, comumente com 10 nucleotídeos, de sequência nucleotídica arbitrária (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A detecção de marcadores co-dominantes tipicamente só é possível ser feita em experimentos que envolvam a análise de segregação de marcadores em progênies lado a lado com os parentais como, por exemplo, durante a construção de mapas genéticos. Os marcadores RAPD não necessitam de informação prévia do DNA, requerem baixa quantidade de DNA, e são acessíveis e de baixo custo (Zucchi, 2002; Leoi, 2003).

Marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) permitem verificar o polimorfismo de DNA a partir da amplificação de fragmentos obtidos pela digestão com enzimas de restrição (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Já os marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*) correspondem a uma pequena região do DNA, aproximadamente 200-300 pb, cuja localização e função no genoma são completamente desconhecidas. Permitem verificar o polimorfismo de DNA a partir da amplificação de fragmentos obtidos pela digestão com enzimas de restrição. Sua grande desvantagem está no baixo polimorfismo detectado (Faleiro, 2007).

Em 1993, os dois pesquisadores Zabeau e Vos, desenvolveram outro marcador molecular denominado AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Essa técnica baseia-se na digestão do DNA com enzimas de restrição e amplificação destes fragmentos via PCR, com adaptadores específicos para cada enzima utilizada. É uma combinação dos marcadores RFLP e RAPD. O AFLP é uma técnica molecular é de elevado custo e grande complexidade (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

No fim dos anos de 1980, os microssatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeat*), foram isolados e descritos simultaneamente por dois grupos de cientistas (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989). Os microssatélites são altamente polimórficos e informativos. Sua herança é co-dominante, o que permite a discriminação entre homozigoto e heterozigoto (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Oliveira et al., 2006; Brondani

et al., 2007). Ellegren (2004) caracteriza o microssatélite como um tipo de marcador molecular constituído basicamente de segmentos curtos de DNA que se repetem sucessivamente, ladeadas por sequências únicas no genoma. O microssatélite está presente em todos os seres vivos e é conhecido por outros nomes como SSR, STR (*Short Tandem Repeats*), STMS (*Sequence Tagged Microssatelite Site*) ou ainda SSLP (*Simple Sequence Lenght Polymorphism*) (Caixeta et al., 2009).

Os microssatélites são constituídos por motivos que possuem de 1 a 6 pares de bases. Essas sequências são repetidas de 5 a 50 vezes, e, em alguns casos, podem chegar a centenas de vezes, como afirmam Ellegren (2004) e Chin et al. (1996). De acordo com Caixeta et al. (2009), os microssatélites podem ser classificados em: i) Perfeitos: quando a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertença ao motivo, por exemplo: TATATATATATATA; ii) Imperfeitos: quando existe entre os motivos, pares de bases que não correspondem ao mesmo, por exemplo: TATATATAcTATATA e iii) Compostos: quando a sequência contém duas sequências repetidas distintas adjacentes, por exemplo: TATATATAGTGTGTGTGT.

Presentes em regiões codantes e não-codantes do genoma, os microssatélites são usualmente caracterizados pelo alto polimorfismo que é decorrente das altas taxas de mutação presente nesses locos. Diferentes hipóteses têm sido formuladas para explicar os mecanismos que levam às altas taxas de mutação que variam de loco para loco, sendo esta variação de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco por geração (Scholotterer, 2000). O "deslizamento" (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA é considerada a principal causa de variação no número de repetições nesses locos (Levinson & Gutman, 1987; Leoi, 2003; Ellegren, 2004). Entretanto, essas sequências podem ser geradas também por recombinação, através de *crossing-over* desigual ou conversão gênica quando se trata de sequências em "tandem" mais longas (Goldstein & Scholotter, 1999).

As sequências que flanqueiam esses motivos repetidos são geralmente únicas no genoma e conservadas entre indivíduos da mesma espécie e até entre espécies relacionadas. Essas sequências únicas servem como molde para a síntese de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de microssatélites, os quais permitirão a amplificação do segmento de DNA que possui esses motivos repetidos, via PCR, ou seja, a amplificação do loco único de microssatélite (Faleiro, 2007; Borem & Caixeta, 2009).

Desta forma, quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando o par de iniciadores complementar às sequências únicas que os flanqueiam, eles

quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho. Esta variação no tamanho dos produtos de PCR é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (Oliveira et al., 2006). Desse modo vários alelos podem ser detectados para uma determinada população. Indivíduos homozigóticos possuem o mesmo número de repetições nos cromossomos homólogos, enquanto indivíduos heterozigóticos possuem número de repetições diferentes nos dois homólogos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Oliveira et al., 2006).

Os marcadores moleculares microssatélites apresentam as características mais desejáveis: são co-dominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados no gel; estão amplamente e uniformemente distribuídos pelo genoma dos eucariotos, são multialélicos; são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA (Tautz, 1989; Oliveira et al., 2006). Deste modo, esse tipo de marcador molecular é ideal para análises de diversidade genética para estudos populacionais e de conservação (Rajora et al., 2000), além, de permitir a construção de mapas genéticos, identificação de locos controladores de características de interesse e seleção assistida por marcadores (Borém & Miranda, 2005).

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), os microssatélites constituem uma das classes de marcadores moleculares mais polimórficos. Entretanto, atualmente, os SNP merecem destaque em função de revelar quase 80% de todo o polimorfismo conhecido em humanos, sendo possível encontrar um SNP a cada mil pares de bases nesta espécie. Apesar dos SNPs serem bastante frequentes e mutacionalmente mais estáveis do que os microssatélites, eles são predominantemente bialélicos o que os torna menos informativos.

Embora exista grande número de marcadores genéticos-moleculares, o princípio da análise desses marcadores é o mesmo. Cada uma das tecnologias de marcadores moleculares apresenta vantagens e desvantagens. O uso de uma ou de outra dependerá do objetivo do estudo, da infra-estrutura, dos recursos financeiros e da disponibilidade de recursos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A aplicação das informações obtidas com marcadores moleculares em recursos genéticos pode ser assim resumida (Faleiro, 2007; Caixeta et al., 2009):

1. Quantidade da diversidade: quantificação da diversidade presente em nível intra e interespecífico;
2. Estrutura da diversidade: como a diversidade esta distribuída entre e dentro de populações no espaço e no tempo;

3. História evolutiva: historia da população, linhagens genéticas, genealogias de genes e distinção entre diversidade, isto é, entre eventos atuais e passados;
4. Distância genética: medida do grau de diferença existe entre genes, sequências, populações e espécies;
5. Relações genéticas: grau de relacionamento entre parentes;
6. Identidade: se indivíduos são geneticamente idênticos ou distintos;
7. Fluxo gênico: extensão no qual os genes foram intercambiados;
8. Desequilíbrio de ligação e correlação inter-loco da variação alélica.

2.4 SISTEMA REPRODUTIVO

O sistema de reprodução refere-se à forma como um indivíduo, população ou espécie recombina sua variabilidade genética a cada geração para formar sua descendência e seu conhecimento é de fundamental importância para a manipulação de populações em programas de conservação e melhoramento genético (Wright, 1921). O sistema reprodutivo tem grande efeito sobre a estrutura genética das populações das espécies vegetais, visto que determina como as informações genéticas são transferidas de uma geração à outra (Loveless & Hamrick, 1984; Holsinger, 2000).

O modo de reprodução assexuada em plantas ocorre de duas formas, por meio da propagação vegetativa e da agamospermia. A propagação vegetativa produz clones através de estruturas somáticas que podem tornar-se independentes da planta genitora em qualquer estágio ontogenético. A agamospermia, por sua vez, consiste na produção partenogenética de sementes (Holsinger, 2000; Silvertown, 2008). O modo de reprodução sexuada envolve meiose e a união de gametas, e é controlada pelo sistema sexual, sistema de reprodução, mecanismos de auto-incompatibilidade, padrões de florescimento e síndromes de polinização (Barrett & Harder, 1996).

Segundo Brown (1990), as espécies vegetais se enquadram em cinco classes de sistema reprodutivo, predominantemente autógama, predominantemente alógama, sistema misto de cruzamento, parcialmente apomíticas e parcialmente autógamas nos gametófitos. Já Fryxell (1957), classifica em quatro os sistemas reprodutivos mais comuns entre as angiospermas: alogamia, autogamia, apomixia e sistema misto. Em um levantamento realizado por Goodwillie et al. (2005) de um total de 345 espécies de angiospermas

estudadas, 44% apresentaram predominância de cruzamentos (alogamia), 42% sistema misto de reprodução e 14% apresentaram sistema de autofecundação (autogamia).

Por adotarem diferentes sistemas reprodutivos, as angiospermas empregam diversas estratégias de cruzamento as quais, buscam otimizar estes sistemas (Karasawa, 2009). Nas espécies autógamas, o pólen pode se movimentar de duas formas: primeiro através da transferência de pólen dentro de uma única flor ou entres flores diferentes de um mesmo indivíduo (Goodwillie et al., 2005; Karasawa, 2009). Na alogamia, a polinização ocorre entre flores de indivíduos diferentes, ou seja, trata-se de cruzamentos entre indivíduos. O sistema misto geralmente ocorre em espécies polinizadas por insetos e que não apresentam sistema de auto-incompatibilidade (Endress, 2001; Karasawa, 2009).

Dentre as diferentes formas de reprodução, a polinização cruzada – alogamia é a reprodução sexual que possui maior potencial de rearranjo da diversidade genética, gerando infinitas combinações, as quais servem de substrato para os fatores evolutivos (Brown, 1990; Vogler & Kalisz, 2001). Contudo, estudos que empregam marcadores isoenzimáticos e moleculares têm demonstrado que a autofecundação não é rara entre as plantas do Cerrado. A grande maioria desses é classificada como alógama ou de sistema misto, com predomínio de alogamia (Collevatti et al., 2001; Telles et al., 2001; Zucchi, 2002; Telles et al., 2010).

Diversos fatores genéticos e ecológicos interferem no sistema reprodutivo de uma espécie. Dentre eles, podemos citar: o sistema sexual (monoicia, dioicia ou hermafroditismo) e a presença de auto-incompatibilidade (Murawski & Hamrick, 1991; Lee, 2000); o tamanho e a densidade populacional, que corresponde ao número de árvores florescendo por hectare (Routley et al., 1999; Franceschinelli & Bawa, 2000); a estrutura espacial, relativa ao modo de distribuição das árvores em florescimento; a fenologia do florescimento, relacionada a variações entre os períodos de floração das plantas (Boshier et al., 1995); o modo de polinização e o comportamento dos polinizadores (Franceschinelli & Bawa, 2000).

Estudos do sistema de reprodução podem ser conduzidos para conhecer qual é a taxa de cruzamento, taxa de autofecundação, a proporção dos cruzamentos que ocorrem entre indivíduos parentes (cruzamentos endogâmicos) e envolvem os mesmos parentais mais de uma vez (cruzamentos biparentais), o número de parentais envolvidos na reprodução de uma planta, o tamanho da área de vizinhança reprodutiva das populações, a divergência no pólen cruzado entre plantas, a distância de dispersão de pólen e as

proporções de pólen que vem de dentro e de fora da população (fluxo gênico). Tais estudos podem ser eficientemente realizados por técnicas tradicionais de observação, ou com a utilização de marcadores genéticos, em especial os de herança codominante e altamente polimórficos, como os microssatélites, desde que se adote uma amostragem delineada adequadamente para os objetivos do estudo (Paiva et al., 1993; Sebben et al., 2000).

Os métodos tradicionais para avaliação do sistema reprodutivo baseiam-se na observação dos cruzamentos e do comportamento dos agentes polinizadores, no exame da morfologia floral e de resultados de experimentos de polinização controlada (Ellstrand, 1992). As taxas de cruzamentos são inferidas pela análise das progênies, mediante marcadores morfológicos conhecidos. Esses métodos fornecem indicações sobre o sistema reprodutivo de uma espécie, mas não permitem uma medida direta do sucesso reprodutivo de populações (Paiva et al., 1993).

O uso de marcadores genéticos para o estudo do sistema de reprodução requer a utilização de modelos genéticos para descrever padrões de reprodução. Ritland & Jain (1981) desenvolveram um algoritmo que permite estimar os valores da taxa de cruzamento e da frequência do pólen simultaneamente, usando genótipos compostos (informações simultâneas de vários locos) para determinar quais progênies foram geradas por autofecundação e quantas por cruzamentos e quanto dos cruzamentos ocorreram entre indivíduos correlacionados em termos genéticos ou foram biparentais.

Quando se utiliza os marcadores genéticos, dois modelos básicos são usados para estimar as taxas de cruzamento e autofecundação, um modelo direto em que progênies individuais resultantes de cruzamentos são identificadas e o indireto que assume que as proporções genotípicas observadas estão nas proporções de equilíbrio de endogamia. Estes métodos devem dar resultados similares se a taxa de cruzamento tem sido constante sobre várias gerações, isto é, se ela atingir as proporções do equilíbrio com endogamia e também se os efeitos da seleção, fluxo gênico e deriva genética sobre as frequências genotípicas em recentes gerações não são muito grandes (Clegg, 1980; Sebbenn et al., 2000). Como todos estes fatores evolutivos podem afetar as frequências genotípicas, as estimativas dos efeitos da endogamia em organismos de autofecundação parcial são usualmente medidos pelo índice de fixação. Contudo, ambas as estimativas diretas e indiretas do índice de fixação deveriam ser iguais ao coeficiente de endogamia se as proporções genotípicas são determinadas somente pelo sistema de reprodução (Ellstrand, 1992).

Dos dois modelos, o direito, também conhecido como modelo misto de reprodução é o mais difundido para avaliação do sistema de reprodução em plantas a partir de marcadores genéticos (Clegg, 1980). As pressuposições básicas do modelo misto são: i) os genótipos foram gerados por cruzamentos aleatórios ou autofecundação; ii) as frequências alélicas do pólen são homogêneas para todos os cruzamentos com genótipos maternos; iii) a taxa de cruzamento é independente do genótipo materno; e iv) não existe seleção atuando nos marcadores entre o período de cruzamento e avaliação genética das progênies (Ritland & Jain, 1981; Ritland, 1990).

O sistema de reprodução, juntamente com os mecanismos de dispersão de pólen e sementes, tem papel fundamental na determinação da estrutura genética espacial e temporal das populações, além de ajudar a entender a distribuição da variação genética entre os indivíduos (Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick & Godt, 1996). Tem se observado, por exemplo, que em espécies predominantemente alógamas, a maior parcela da variação genética encontra-se dentro de populações, enquanto que, em espécies autógamas a maior parte da variação encontra-se entre as populações (Murawski & Hamrick, 1991).

Informações a respeito do sistema de reprodução são de fundamental importância na implementação de programas de melhoramento e conservação genética (Boshier et al., 1995; Souza et al., 2003). Com essas informações, é possível avaliar o efeito da ação humana sobre esses processos e estabelecer as estratégias mais adequadas que otimizem a amostragem da variabilidade genética (Brown, 1990; Boshier et al., 1995; Martins et al., 2006) e a adoção de modelos genéticos-estatísticos adequados para a estimativa de parâmetros genéticos (Souza et al., 2003).

2.5 FLUXO GÊNICO EM ESPÉCIES VEGETAIS

O termo fluxo gênico é utilizado para todos os mecanismos que resultam em movimentos de genes dentro de uma população e de uma população para outra (Slatkin, 1987). Dessa forma, enquanto os efeitos da seleção natural, mutação e deriva genética levam a diferenciação dentro e entre populações, o fluxo gênico atua no sentido contrário, homogeneizando a variação genética espacial dentro e entre populações, alem de poder induzir nova variação (Wright, 1949; Hamrick et al., 1993). Portanto, o conhecimento

sobre a dinâmica do fluxo gênico é essencial na compreensão do potencial evolutivo da espécie, fornecendo subsídios para a conservação e manejo.

As plantas dispersam seus genes durante dois estágios do seu ciclo de vida: antes da fertilização, pelo movimento de pólen, e após a fertilização e desenvolvimento do embrião, por meio da dispersão de sementes. Uma vez que o fluxo gênico via pólen e via semente são eventos independentes, espécies de plantas com dispersão de pólen efetiva de longo alcance, porém, com dispersão de semente localizada pode ter menos variação genética entre populações geograficamente separadas, o que desencadeia ocorrência de grupos de indivíduos aparentados (Nason & Hamrick, 1997). O reconhecimento desses estágios de dispersão gênica é fundamental para se compreender a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações de plantas (Levin, 1981), além de fornecer bases para compreensão dos padrões demográficos e formação das comunidades vegetais (Hardy et al., 2006).

De acordo com Futuyma (1992), diferenças na estrutura da população são correspondentes aos diversos modelos de fluxo gênico (Figura 1), dentro os quais se destacam: a) modelo continente-ilha, que se baseia no movimento unidirecional de uma fonte efetivamente grande (continental) para uma menor e isolada (ilha) (Wright, 1943); b) o modelo de ilhas em que uma população é subdividida em subpopulações (demes) separadas geograficamente e o fluxo gênico ocorre ao acaso entre as subpopulações e todas contribuem da mesma forma com o fluxo gênico (Wright, 1931); c) o modelo "*stepping stone*" no qual a migração acontece por passos somente entre populações vizinhas (Kimura & Weiss, 1964); d) o de isolamento por distância no qual o fluxo gênico ocorre com maior frequência entre indivíduos espacialmente mais próximos do que entre os mais distantes, levando a uma diferenciação entre grupos de indivíduos que estão espacialmente mais distantes na população (Wright, 1943).

As estimativas de fluxo gênico em plantas podem ser obtidas de forma direta ou indireta. As medidas diretas referem-se ao fluxo gênico contemporâneo, enquanto que as indiretas são baseadas na estrutura de populações e referem-se ao fluxo gênico histórico (Levin, 1981; Ellstrand, 1992; Zucchi, 2002). Os métodos diretos se baseiam na observação da dispersão de pólen ou semente, através da utilização de corantes e marcadores morfológicos. Atualmente, vários marcadores moleculares estão disponíveis e então, muitos trabalhos empregam a análise de paternidade para se estimar o fluxo de pólen contemporâneo. Essa análise consiste na utilização de um conjunto de marcadores

polimórficos como, por exemplo, os microssatélites, para obtenção dos genótipos dos indivíduos da progênie e dos doadores de pólen de uma população. Obtendo-se a distância espacial entre a mãe e o doador de pólen a distância de fluxo de pólen é obtida (Marshall et al., 1998).

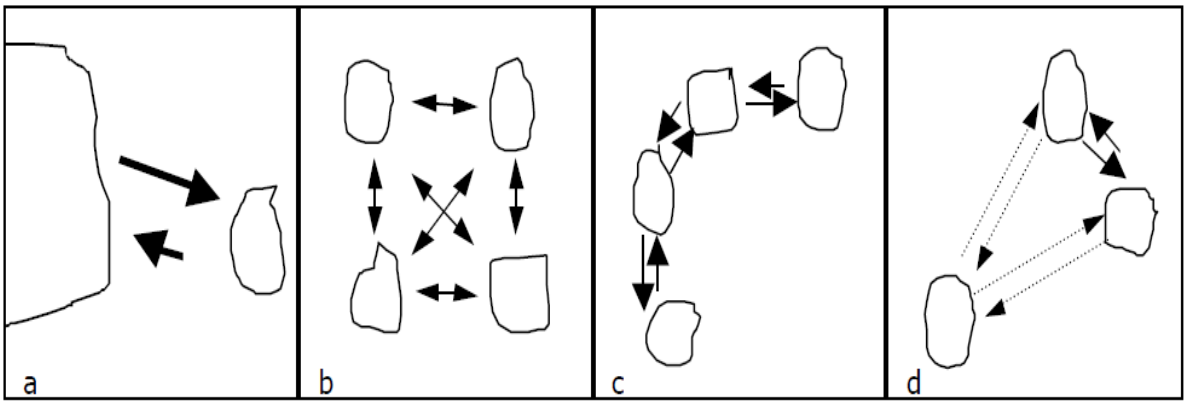

Figura 1. Modelos de fluxo gênico. a) Modelo continente-ilha; b) Modelo de ilhas; c) Modelo "*stepping stone*"; d) Modelo de Isolamento por Distância (Fonte: Zucchi, 2002).

Os primeiros estudos de análise de paternidade eram baseados na estimativa de exclusão. Entretanto, este método pode identificar erroneamente um doador de pólen verdadeiro por apresentar alguns problemas causados por erros de genotipagem ou mutações (Marshall et al., 1998; Jones & Ardren, 2003). A estatística Delta (Δ), definida por Marshall et al. (1998), auxilia na determinação da paternidade e é baseada no método da máxima verossimilhança. Esse método tolera erros de genotipagem e define o indivíduo com mais chance de ser o verdadeiro doador de pólen com base nas frequências alélicas da população e no compartilhamento de alelos de frequências menores entre um candidato à doador de pólen e do indivíduo da progênie que está sendo testada (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007).

Os métodos indiretos baseiam-se na estrutura genética das populações, isto é, na distribuição da diversidade genética entre populações para obter a estimativa do número efetivo de migrantes por geração, em um escala de tempo evolucionária (Sork et al., 1999; Martins et al., 2006). Pela abordagem indireta, a distribuição dos alelos é quantificada e um modelo genético populacional é aplicado para estimar qual taxa de fluxo gênico resultaria em uma distribuição similar. Uma análise para esse tipo de estimativa foi proposta por (Smouse et al., 2001), através do programa TWOGENER. As estimativas da extensão do movimento de pólen são obtidas com base na diferenciação do conjunto de pólen recebido

pelas arvores mães (Φ_{ft}). Com base nessa diferenciação, é fornecida a distância média de dispersão de pólen e o número efetivo de doadores de pólen (Smouse et al., 2001; Robledo-Arnuncio et al., 2007). Outro método indireto de estimar o fluxo gênico é através da estrutura genética espacial intrapopulacional. Essa abordagem avalia principalmente a dispersão restrita de sementes, uma vez que, para a existência de um evento de fluxo gênico faz-se necessário o estabelecimento de sementes no habitat (Hardy et al., 2006).

Contudo, para efetivação de qualquer estratégia de conservação e manejo dos recursos genéticos vegetais do Cerrado, é essencial o conhecimento dos níveis de da distribuição da variabilidade genética de uma espécie. Por sua vez, esta estrutura genética é o resultado da interação de vários fatores reprodutivos e evolutivos (seleção natural, deriva genética e fluxo gênico). De fundamental importância é conhecer o fluxo gênico contemporâneo, dado que este determina como os genes são transmitidos de uma geração para outra (Ellstrand, 1992; Cottrell et al., 2009).

2.6 A ESPÉCIE *Eugenia dysenterica* DC.

A região do Cerrado é muito rica em espécies frutíferas nativas, oferecendo uma grande quantidade de frutos comestíveis, com formas variadas, cores atrativas e sabor característico, muitos de excelente aceitação no mercado local (Trindade, 2001). Algumas dessas espécies frutíferas do Cerrado constituem fontes potenciais de exploração econômica, desde que a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias viabilizem seu aproveitamento sem promover erosão genética (Chaves & Telles, 2006). Neste contexto, insere-se a *Eugenia dysenterica* DC. (cagaiteira) (Figura 2), uma espécie frutífera nativa do Cerrado, aproveitada pela população local para uso alimentar e medicinal (Almeida & Sano, 1998; Silva et al., 2008).

Pertencente à família Myrtaceae, a *E. dysenterica*, também conhecida como cagaiteira em razão de suas propriedades laxativas, é uma árvore frutífera que apresenta grande potencial de utilização em sistemas tradicionais de produção agrícola. A família a qual pertence essa espécie é composta por 14 gêneros, representados por 211 espécies de ocorrência natural no bioma Cerrado, sendo uma das 10 famílias mais representativas do bioma que juntas contribuem com mais de 51% de sua riqueza florística (Chaves & Telles, 2010).

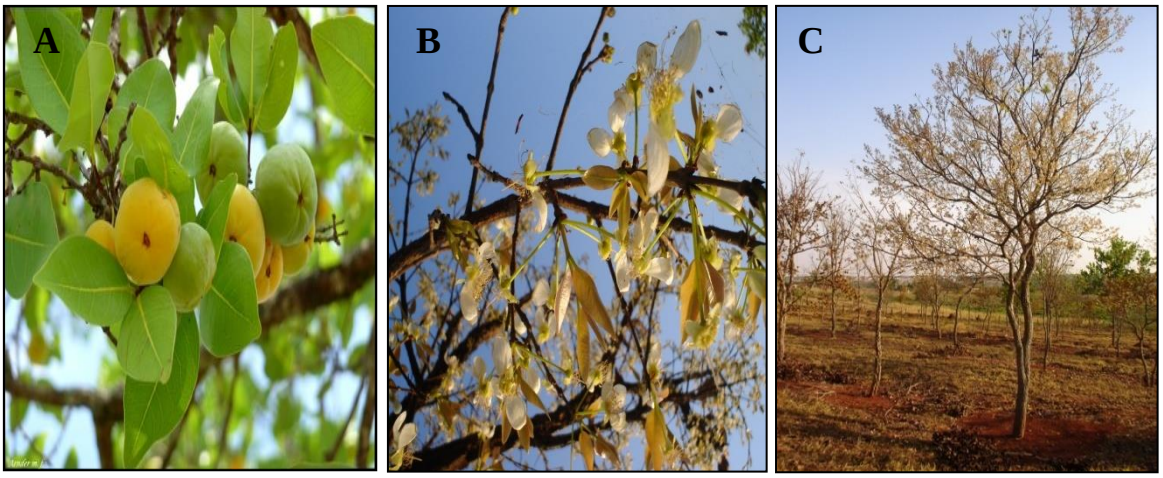

Figura 2. *Eugenia dysenterica* DC. A) ramos com frutos verdes e maduros; B) ramos com flores; C) indivíduos adultos da coleção de germoplasma *in vivo* da Universidade Federal de Goiás (Fonte: o autor).

Segundo Naves (1999), a cagaiteira ocorre em maior densidade nos Latossolos Vermelho-Amarelos, sendo frequente em áreas com temperaturas médias anuais variando entre 21°C e 25°C e altitudes de 380 m a 1.100 m. É uma planta típica nos cerradões, cerrado *stricto sensu* e campos sujos dos Estados de Goiás, Tocantins, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Piauí, Maranhão e Distrito Federal (Brito et al., 2003; Chaves & Telles, 2010) (Figura 3).

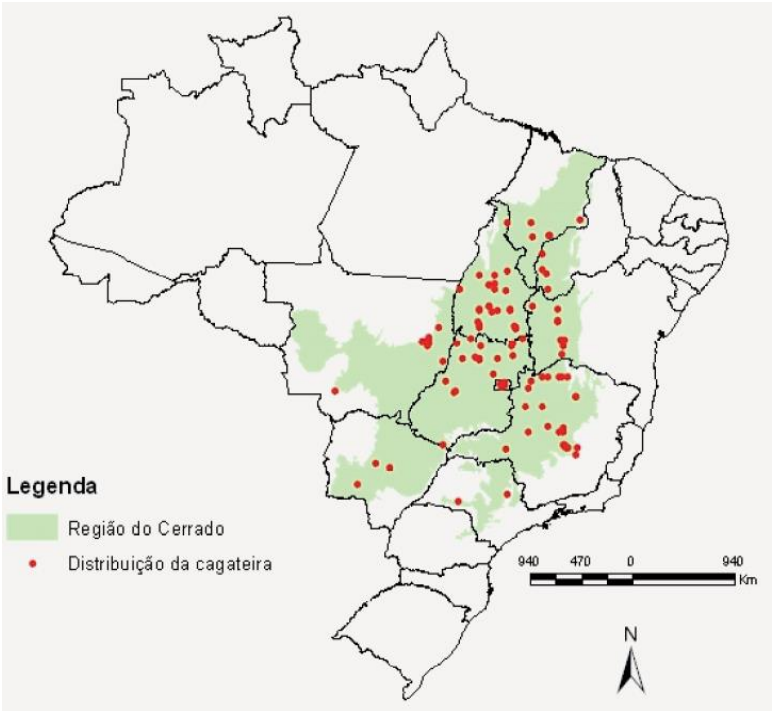

Figura 3. Distribuição natural de *Eugenia dysenterica* em 110 localidades entre 376 levantamentos realizados no Bioma Cerrado (Fonte: Ratter et al., 2000).

Corrêa (1984) acrescenta à classificação de Cruz (1979) que a espécie *E. dysenterica* constitui-se em uma árvore de porte médio, possuindo de quatro metros a dez metros de altura, tronco tortuoso e cilíndrico, com vinte a quarenta centímetros de diâmetro e uma casca suberosa e fendada bem característica. Sua copa é alongada e densa, com ramos quadrangulares e glabros, exceto os botões, pedicelos, folhas e ramos jovens que são pubérulos. É uma planta decídua, heliófita e seletiva xerófila. Apresenta folhas membranáceas, opostas, simples, curto-pecioladas a subsésseis, glabras, aromáticas e caducas na floração. Suas flores, sempre axilares, solitárias ou organizadas em arranjos de três, são hermafroditas e completas, com 1,5 cm a 2 cm de diâmetro, dotadas de pétalas de coloração branca (Lorenzi, 2002).

No Cerrado, o florescimento da *E. dysenterica* dá-se de agosto a setembro, geralmente sincronizado com o início das primeiras chuvas ou até mesmo antes delas, não durando mais que uma semana. Juntamente com o florescimento surge um fluxo de novas brotações ricas em pigmentação vermelha (Proença & Gibbs, 1994). No espaço de um mês ocorre o florescimento, produção de nova folhagem e frutificação (Sano et al., 1995).

Proença e Gibbs (1994), desenvolvendo trabalho sobre a biologia reprodutiva de oito espécies da família Myrtaceae do Brasil Central, concluíram que *E. dysenterica* apresentou polinização por abelhas (incluindo *Bombus* ssp.), com as flores se abrindo pela manhã e se mantendo abertas por um dia, seguindo um padrão de floração que os autores denominaram de "*big-bang*", ou seja, ocorre uma floração muito intensa das plantas por um período relativamente curto de tempo. Embora os resultados obtidos não tivessem sugerido a existência de nenhuma forma de auto-incompatibilidade, os autores concluíram, com base em dados de cruzamentos controlados, que esta espécie deve apresentar um sistema de reprodução predominantemente por alogamia. Certo grau de alogamia em espécies auto-compatíveis pode ser conseguido por uma estratégia de florescimento de condições uniformes (*Pisidium firmum*) ou comportamento oportunista dos polinizadores em espécies com estratégias de florescimento em massa, tais como *E. dysenterica* e *Myrcia rhodosepala*.

O fruto da cagaiteira é uma baga globosa-achatada, amarelo-pálida, de 2 cm a 3 cm de diâmetro, contendo de 1 a 3 sementes brancas, envoltas em uma polpa levemente ácida. Apresenta um cálice seco aderido ao fruto, casca brilhante membranácea, mesocarpo e endocarpo suculentos. A cagaiteira é considerada uma espécie de interesse econômico, principalmente por causa do aproveitamento de seus frutos na culinária. Além do consumo

in natura, são inúmeras as receitas de doces e bebidas que levam o sabor de sua polpa. Esse aproveitamento é bastante difundido entre os habitantes do Cerrado, podendo ser encontrados, inúmeros pratos típicos da região, com destaque para os doces, geleias, licores, refrescos, sorvetes e sucos. Seus frutos, porém, quando consumidos em excesso ou quentes, podem causar diarréia e embriaguez. Ainda imaturos podem ser utilizados como forragem para o gado. De sua polpa também são obtidos vinagre e álcool (Corrêa, 1984; Sano et al., 1995).

A melhoria do sistema de produção da cagaiteira é extremamente necessária, já que se verifica um aumento na procura de espécies nativas para a exploração comercial, atentando-se para um mercado em expansão e à necessidade de novas alternativas econômicas para populações regionais (UFLA, 2008). Além desse apelo comercial, a devastação do Cerrado em virtude da expansão agrícola tem conduzido muitas espécies endêmicas a uma acentuada erosão genética (Chaves & Telles, 2010). Portanto, torna-se imprescindível investir em programas de domesticação e conservação da cagaiteira, para que possa ser cultivada de forma comercial e sem riscos de erosão genética.

A variabilidade genética dentro de uma espécie é fundamental para garantir seu potencial adaptativo frente às adversidades ambientais. Quantificar essa variabilidade dentro das populações é crucial para avaliar como as espécies enfrentam o ambiente e se mantém vivas e reprodutivas ao longo dos tempos, principalmente na região do Cerrado, considerado um domínio rico em biodiversidade (Ribeiro & Rodrigues, 2006). A quantificação dessa variabilidade dentro de coleções de germoplasma fornece bases para a proteção de alelos que poderão ser utilizados, futuramente, em estratégia de melhoramento ou que são ameaçados de erosão genética devido à exploração humana (Vallois et al., 2001).

Nesse sentido, a espécie *Eugenia dysenterica* DC. tem sido estudada ao longo das ultimas décadas, com objetivos variados. Em 1994, Proença & Gibbs avaliaram oito espécies da família Myrtaceae brasileiras, incluindo a cagaiteira. Os autores avaliaram aspectos fenológicos e a biologia reprodutiva dessas espécies. Na ocasião foram observados que as abelhas do gênero *Bombus* são os seus principais polinizadores cagaiteira. No ano seguinte, Sano et al. (1995) estudaram a fenologia de dez populações de cagaiteira em um Cerrado de Planaltina – DF. Neste trabalho os autores concluíram que todas as atividades de troca das folhas, floração e frutificação ocorrem no início do período das chuvas, entre agosto e outubro.

Silva et al. em 2001 avaliaram dados fenotípicos das árvores e dos frutos de cagaiteira de 10 áreas da região sudeste do Estado de Goiás. Os autores observaram que, para todos os caracteres de frutos, a variação entre as plantas dentro de subpopulação e entre as subpopulações foi significativa. Com relação aos dados fenotípicos das árvores, observou-se que na subpopulação que ocorre em uma área urbana as plantas apresentaram altura média e área basal superior às demais. No mesmo ano, Telles et al. (2001) avaliaram 112 progênies provenientes de coletas realizadas nas 10 subpopulações naturais distribuídas na região sudeste do Estado de Goiás, que haviam sido avaliadas fenotipicamente por Silva et al. (2001). As plantas foram avaliadas geneticamente a partir de marcadores isoenzimáticos. Foram utilizados também dados edáficos dos locais de origem dessas 10 subpopulações, referentes ao solo. Os resultados mostraram que a variabilidade genética entre as subpopulações de cagaiteira está correlacionada com as variáveis relativas ao fenótipo das árvores por um efeito indireto do padrão espacial, o que pode ser explicado por um processo estocástico de diferenciação. Foi observado ainda que os fenótipos das árvores são influenciados pelo tipo de solo onde a população se encontra, que são independentes da distribuição espacial e da divergência genética.

Zucchi et al. (2003) avaliaram 116 plantas de cagaiteira provenientes das 10 subpopulações utilizadas por Telles et al. (2001) e Silva et al. (2001). Na ocasião as plantas foram avaliadas a partir de 10 pares de iniciadores microssatélites desenvolvidos para *Eucalyptus grandi* e *Eucalyptus urophilla* por Brondani et al. (1998) e transferidos para *Eugenia dysenterica* DC. por Zucchi et al. (2002). Os resultados desse trabalho revelaram que a variabilidade genética está fortemente estruturada nas subpopulações e que a espécie se comporta como alógama. As mesmas 10 subpopulações do sudeste do Estado de Goiás também foram avaliadas com marcadores RAPD por Zucchi et al. (2005). Os resultados apoiam a forte estruturação apontada pelos microssatélities e também a existência de uma correlação positiva significativa entre distância genética e distância geográfica (r = 0,77; p < 0,001) sugerindo que as subpopulações estão se diferenciando de acordo com o modelo de isolamento por distância.

Trindade & Chaves (2005) avaliaram plantas de cagaiteira provenientes de 13 áreas do nordeste do Estado de Goiás com o objetivo de caracterizar a estrutura genética das subpopulações dessa região a partir de caracteres morfológicos e marcadores RAPD. Os autores evidenciaram que a maior proporção da variabilidade, tanto fenotípica quanto genotípica está dentro das subpopulações. O peso dos frutos foi o caráter morfométrico que

mais contribuiu para a divergência entre as subpopulaçõs. O nível de estruturação da variabilidade genética nas subpopulações foi baixo (Φ_{ST} = 0,08), bem inferior ao encontrado para as subpopulações do sudeste do Estado de Goiás (Φ_{ST} = 0,27) por Zucchi et al. (2005). Os autores discutem que essa discrepância pode ser em função da proximidade das subpopulações estudadas, indicando um fluxo gênico atual mais intenso entre elas.

Aguiar et al. (2009) estimaram parâmetros genéticos de caracteres quantitativos de progênies de cagaiteira, que fazem parte da coleção de germoplasma da Escola de Agronomia e Engenharia de alimentos da Universidade Federal de Goiás. Essas progênies foram formadas a partir de sementes coletadas nas 10 subpopulações naturais avaliadas por Telles et al. (2001) e Zucchi et al. (2003; 2005). Os autores observaram altos níveis de variação genética para os caracteres avaliados, sendo que a maior parte encontra-se dentro das subpopulações. As estimativas dos parâmetros genéticos sugerem ainda bons progressos esperados com a seleção, indicando que a coleção pode ser convertida em um pomar de sementes por mudas, sem desbaste, coletando as sementes das árvores fenotipicamente superiores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA

O presente estudo foi conduzido em uma coleção de germoplasma *in vivo* e e*x situ* de *Eugenia dysenterica* DC. mantida em uma estação experimental pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG), em Goiânia-GO. A coleção foi implementada há mais de doze anos em uma área experimental que se localiza nas seguintes coordenadas geográficas: 16º35'12" de latitude sul e 49º21'14" de longitude oeste a 730 m de altitude. As primeiras prospecções e coletas para a formação dessa coleção foram realizadas em com o objetivo de obter germoplasma oriundo de dez localidades da região sudeste do Estado de Goiás (Tabela 1). Para a formação da coleção, as plântulas foram obtidas a partir de sementes amostradas de 110 matrizes, variando de 8 a 12 matrizes por localidade, que foram posteriormente transferidas para o solo da estação experimental da EA/UFG em janeiro de 1998, obedecendo ao espaçamento de 6,0 m x 6,0 m, em blocos completos casualizados, com quatro repetições e uma planta por parcela, constituindo 440 plantas.

Tabela 1. Localidades amostradas e coordenadas geográficas das populações de *Eugenia dysenterica* na região sudeste do Estado de Goiás, 1996.

Pop.	N. dos acessos na coleção	Localidade	Localização da população (GPS)		
			Latitude	Longitude	Altitude
1	1 ao 12	Catalão	18º 07’ 35”	47º 54’ 20”	880
2	13 ao 24	Catalão	18º 02’ 0,3”	48º 02’ 31”	860
3	25 ao 36	Catalão	18º 13’ 39”	47º 58” 12”	800
4	37 ao 48	Três Ranchos	18º 17’ 15”	47º 48’ 41”	820
5	49 ao 60	Campo Alegre de Goiás	17º 39’ 11”	47º 46’ 37”	930
6	61 a 72	Campo Alegre de Goiás	17º 34’ 24”	47º 42’ 12”	780
7	73 ao 80	Cristalina	17º 10’ 47”	47º 31’ 07”	890
8	81 ao 92	Luziânia	16° 28’ 48’’	47° 48’ 40’’	900
9	93 ao 100	Goiânia	16º 40’ 30”	49º 14’ 42”	740
10	101 ao 112	Senador Canedo	16° 37’ 13’’	49° 04’ 29’’	840

Fonte: Telles (2000).

Foram coletadas folhas de todas as árvores da coleção de germoplasma com origem na região sudeste do Estado de Goiás, sendo amostradas um total de 404 plantas, o que representa 92% das plantas, que são as que sobreviveram na coleção após o plantio. Além das folhas, também foram coletados frutos de 23 árvores (matrizes) da coleção amostradas aleatoriamente (Figura 4). Foi coletado um total de 542 sementes, variando entre 15 a 44 por matriz, dependendo da disponibilidade de frutos em cada árvore naquele período.

Figura 4. Esquema experimental da coleção de germoplasma de *Eugenia dysenterica DC.* mantida em uma estação experimental pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG), em Goiânia-GO. Os círculos representam as árvores matrizes.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A etapa de coleta de dados moleculares foi realizada no laboratório de Genética & Biodiversidade, da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, Goiás. O DNA genômico total dos adultos, incluindo as matrizes, foi extraído, a partir do tecido foliar, conforme o protocolo de extração proposto por Doyle & Doyle (1987) e descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). O DNA genômico dos cotilédones das sementes, também, foi extraído seguindo o mesmo protocolo. Após a extração, o DNA total foi quantificado com o auxílio de um marcador de peso molecular (*Low DNA mass ladder* da Invitrogen®), em gel de agarose 1% e tampão para eletroforese TBE 1X. Em seguida, o DNA foi diluído para uma concentração de trabalho de, aproximadamente, 2,5 ng μL^{-1} e armazenado a -20ºC.

Para as reações de amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com o DNA de cada indivíduo, foram utilizados oito pares de iniciadores para regiões

microssatélites, em que, quatro foram originalmente desenvolvidos para *Eucalyptus* ssp. e transferidos para *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al., 2002), e os outros quatro iniciadores foram desenvolvidos para a espécie *Eugenia dysenterica* (Telles et al., submetido) (Tabela 2). As reações foram preparadas a partir de um coquetel de ragentes para um volume final de 15 µl, contendo cerca de 15 ng μl^{-1} de DNA genômico, 1X Tampão da Enzima 10X; 1,6 mM $MgCl_2$; 0,21 mM dNTPs; 2,16 mg BSA; 0,26 mM Iniciador (*foward + reverse*) e 1U de *Taq* DNA Polimerase.

Tabela 2. Relação dos pares de iniciadores de regiões microssatélites utilizados e suas características, em que *AVA* refere-se à variação da amplitude alélica de cada loco microssatélite e *Ta* a temperatura de anelamento do iniciador.

SSR	**Motivo**	***Ta (ºC)***	***AVA***
SSR desenvolvidos para *Eucalyptus* spp. e transferidos para *E. dysenterica*			
EMBRA-14	$(AG)_8AAC(AG)_{25}$	56	103/167
EMBRA-72	$(AG)_{14}$	56	135/175
EMBRA-172	$(GA)_{19}$	56	182/208
EMBRA-210	(TC)25	56	180/254
SSR desenvolvidos para *E. dysenterica*			
ED-004	$(GA)_{14}$	64	222/266
ED-005	$(GA)_{16}$	61	210/240
ED-008	$(AG)_{10}$	60	186/196
ED-009	$(AG)_{10}$	62	206/218

Para a amplificação do DNA a partir dos iniciadores desenvolvidos para cagaita, o programa de termociclagem foi composto dos passos descritos a seguir: (1º) desnaturação do DNA a 95ºC por 5 minutos; (2º) 94ºC por 1 minuto; (3º) temperatura específica de anelamento do iniciador por 1 minuto; (4º) extensão da molécula pela enzima *Taq* DNA polimerase a 72ºC por 1 minuto; (5º) 30 ciclos seguindo do 2º ao 4º passo; (6º) passo final de extensão de 7 minutos para finalizar os produtos amplificados. Para a amplificação do DNA a partir dos iniciadores transferidos de eucalipto foi empregado os seguintes passos de termociclagem: (1º) desnaturação do DNA a 96ºC por 3 minutos; (2º) 94ºC por 30 segundos; (3º) temperatura específica de anelamento do iniciador por 1 minuto; (4º) extensão da molécula pela enzima *Taq* DNA polimerase a 72ºC por 1 minuto; (5º) 30 ciclos seguindo do 2º ao 4º passo; (6º) passo final de extensão de 7 minutos para finalizar os produtos amplificados.

Após a amplificação, os fragmentos de DNA resultantes foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%, utilizando tampão TBE 1X, como 85W por cerca

de duas horas e meia. A coloração foi realizada com nitrato de prata, seguindo o protocolo de Creste et al. (2001) e, após a secagem das placas, o tamanho das alelos foi determinado por comparação com o marcador de peso molecular padrão com intervalo de 10 pares de bases (Invitrogen®).

Após a conclusão da obtenção dos genótipos de todos os indivíduos, a confirmação de cada um dos alelos foi realizada a partir de uma nova eletroforese, contendo uma amostra de cada um dos alelos existentes, confirmando, assim, a existência e o tamanho de todos os alelos. Além disso, a fim de detectar a evidência de possíveis erros durante a determinação dos genótipos, foi utilizado o programa Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004), que possibilita investigar a existência de alelos nulos, *stutter* e *dropout*.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE NOS LOCOS MICROSSATÉLITES

Para a caracterização dos locos microssatélites e da diversidade genética presente na coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, foram utilizados os genótipos dos indivíduos das duas gerações (indivíduos adultos da coleção e progênies) para os oito locos microssatélites. Para cada loco e depois para o conjunto de locos foram estimados os seguintes parâmetros genéticos básicos: número médio de alelos por loco (*A*), frequências alélicas e heterosigozidade esperada sob condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg (*He*). Essas estimativas foram obtidas utilizando o programa FSTAT (Goudet, 1995; Goudet, 2001)

Utilizando as frequências alélicas obtidas para todos os locos dos indivíduos adultos da coleção, e a fim de conhecer o poder de discriminação dos locos, foram estimados dois parâmetros importantes para estudos de parentesco e paternidade: a) probabilidade de identidade genética (*I*) (Paetkau et al., 1995), que corresponde à probabilidade de dois indivíduos amostrados ao acaso apresentarem o mesmo genótipo para um determinado loco e b) probabilidade de exclusão de paternidade (*Q*) (Weir, 1996), que corresponde ao poder que determinado loco tem de excluir um indivíduo erroneamente designado como pai. Adicionalmente, também foi estimada a probabilidade de identidade

genética combinada, $IC = \prod I_i$, e a probabilidade de exclusão combinada, $QC = 1 - [\prod(1 - Q_i)]$, para todos os locos caracterizados.

3.4 AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTIVO

A avaliação das características do sistema reprodutivo de *E. dysenterica* foi realizado com base nos modelos de cruzamento misto de Ritland & Jain (1981) e cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989), utilizando o programa "Multilocos MLTR" (Ritland, 2002). O modelo de cruzamento misto assume que as progênies resultam de uma mistura de autofecundação e fecundação cruzada.

As pressuposições do modelo misto, descritos por Ritland & Jain (1981) são: i) o conjunto de pólen é homogêneo para o cruzamento de todos os genótipos maternos; ii) a fecundidade é uniforme entre as plantas, isto é, todas as plantas têm igual capacidade de gerarem descendentes; iii) os alelos de diferentes locos segregam independentemente (equilíbrio de ligação); iv) os locos avaliados não sofreram seleção ou mutação entre o período de fertilização e a análise dos indivíduos.

O programa MLTR (Ritland, 2002) foi utilizado para se obter as seguintes estimativas: frequências alélicas do óvulo e do pólen envolvidos nos cruzamentos; índice de fixação nas matrizes ($\hat{F}_{mat}$); taxa populacional de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$); taxa populacional de cruzamento uniloco ($\hat{t}_s$); taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$); correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$) e correlação uniloco de paternidade ($\hat{r}_{p(s)}$). O desvio padrão (*DP*) das estimativas foi obtido através de 1000 reamostragens *bootstraps* e usado para calcular o intervalo de confiança de 95% de probabilidade, $IC_{95\%} = 1{,}96\ (DP/\sqrt{n})$, em que *n* representa o número de progênies.

Os parâmetros do sistema de cruzamento, em especial as correlações de paternidade foram utilizadas para estimar outros parâmetros demográficos e genéticos. O número efetivo de doadores de pólen ou tamanho da vizinhança reprodutiva foi calculado da correlação de paternidade por $\widehat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p$. Dos parâmetros de cruzamento foram estimados ainda a proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{S}$), irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m\hat{r}_p$) e meios-irmãos ($\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m(1 - \hat{r}_p)$) contidos nas progênies.

A homogeneidade nas frequências alélicas do pólen e dos óvulos é uma das pressuposições básicas do modelo misto de reprodução proposto por Ritland & Jain (1981). Violações desta pressuposição causam poucos efeitos nas estimativas da taxa de cruzamento multiloco (Ritland & Jain, 1981) e permitem estudar outras facetas do sistema reprodutivo em populações naturais como desvios de cruzamentos aleatórios (Sebbenn et al., 2000; Bittencourt & Sebbenn, 2007). A homogeneidade entre as frequências alélicas dos conjuntos de óvulos e pólen foi avaliada pela estimativa de F_{ST} (Nei, 1977), como uma medida de divergência genética entre as frequências alélicas de grupos distintos. A significância de $F_{ST,}$ para cada loco, foi testada pelo método do qui-quadrado proposto por (Workman & Niswander, 1970):

$$\chi^2 = 2nF_{ST}(k-1) \qquad GL = (k-1)(g-1)$$

Em que, *n* é o número de indivíduos nos dois grupos, *k* o número de alelos e *g* equivale ao número de grupos.

A fim de conhecer o parentesco em uma geração de progênies oriundas da coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, estimou-se o coeficiente médio de coancestria (θ_{xy}) entre indivíduos dentro de progênies. O coeficiente de coancestria foi obtido a partir do coeficiente de correlação dentro de progênies, calculado a partir de parâmetros do sistema reprodutivo conforme derivações de Ritland & Jain (1989):

$$\hat{r}_{xy} = 0{,}25(1+\hat{F})\left[4\hat{s} + (\hat{t}^2 + \hat{r}_s\hat{t}\hat{s})(1+\hat{r}_p)\right]$$

Sendo $\hat{F}$ o coeficiente de endogamia na geração parental e $\hat{s}$ a taxa de autofecundação, e os demais parâmetros foram definidos anteriormente. Em espécies diplóides, na ausência de endogamia, o coeficiente de parentesco ($\hat{r}_{xy}$) é o dobro do coeficiente de coancestria (θ_{xy}), de forma que $\theta_{xy} = \hat{r}_{rx}/2$.

Adicionalmente, para conhecer a representatividade genética das progênies, estimou-se o tamanho efetivo de variância $(\widehat{N}_{e(v)})$ da progênie com base na variância amostral das frequências (Cockerham, 1969):

$$\widehat{N}_{e(v)} = \frac{0{,}5}{\hat{\theta}_{xy}\left(\frac{n-1}{n}\right) + \left(\frac{1+\hat{F}_p}{2n}\right)}$$

Em que, *n* corresponde ao tamanho amostral (número de plantas por progênie) e F_p é o índice de fixação nas progênies.

O valor teórico máximo do tamanho efetivo de variância esperado em uma progênie de uma população ideal (tamanho infinito, sob panmixia, sem a ocorrência de seleção, mutação, deriva genética e migração) é aproximadamente quatro. Com as estimativas do tamanho efetivo de variância $\left(\widehat{N}_{e(v)}\right)$, estimou-se o número de matrizes necessárias para reter um tamanho efetivo $\left(\widehat{N}_{e(ref)}\right)$ igual a 100, sendo este número calculado pela divisão $\left(\widehat{N}_{e(ref)}/\widehat{N}_{e(v)}\right)$, como apresentado por Sebben (2000).

3.5 ANÁLISE DE PATERNIDADE E DISTÂNCIA DE DISPERSÃO DE PÓLEN

Para as análises de atribuição de paternidade, os genótipos das 542 sementes oriundas de 23 árvores matrizes foram utilizados, conforme ilustrado na Figura 4. Para determinar os possíveis doadores de pólen para o conjunto de sementes avaliadas, foram utilizados como candidatos os 404 indivíduos adultos e as 23 matrizes. A paternidade foi estimada utilizando o método de alocação categórica (Jones & Ardren, 2003) através do programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

O programa CERVUS 3.0 permite inferir a paternidade através da razão de verossimilhança (*likelihood ratio*, *LR*) entre as probabilidades de duas hipóteses alternativas para cada candidato a doador de pólen. A hipótese H_1 representa o candidato a doador de pólen verdadeiro e H_0 representa um candidato a doador de pólen de ocorrência aleatória na população, de modo que razão de verossimilhança é:

$$LR = \frac{H_1}{H_0}$$

Para cada candidato é calculada um *LR* total, por multiplicação das *LR* de cada loco individual, assumindo-se segregação independente entre locos. O logaritmo natural (ln) deste *LR* total é denominado de *LOD score*. Um *LOD score* positivo indica que o candidato é mais provável de ser o doador de pólen verdadeiro, do que o outro selecionado aleatoriamente. Quando dois ou mais candidatos apresentaram um LOD *score* positivo, uma estatística Δ (delta) foi aplicada. Essa estatística é definida como sendo a diferença do *LOD score* entre o doador de pólen mais provável (maior *LOD score* positivo) e o segundo

doador de pólen mais provável (segundo maior *LOD score* positivo). A significância dos valores de Δ é testada por testes de paternidade simulados pelo próprio programa.

A simulação utiliza as frequências alélicas observadas na população para simular dados genéticos e conduzir testes de paternidade para um grande número de progênies, com o objetivo de gerar distribuições do Δ. As simulações levam em conta o número de candidatos a doador de pólen, a proporção amostrada de candidatos a doador de pólen, a proporção de locos que foram genotipados nos indivíduos e a frequência de erros de genotipagem. Na etapa final da simulação são gerados valores críticos de Δ, de modo que a significância dos valores de Δ encontrados nos testes de paternidade conduzidos na população estudada possa ser determinada. A árvore candidata a doador de pólen com o maior *LOD score* será indicada se a diferença entre o seu *LOD score* e o do segundo candidato a doador de pólen (*Δ score*) for maior do que o Δ crítico.

Os parâmetros usados nas inferências de paternidade com o programa CERVUS foram os seguintes: admitiu-se que cada semente tinha 404 prováveis doadores de pólen; que a proporção de árvores adultas amostradas foi 90%; que a proporção de locos genotipados foi de 100% e que a taxa de erro de genotipagem foi de 0,01. Foram usadas 10.000 repetições nas simulações e os níveis de confiança restrito de 99% e relaxado de 95%, para determinar o verdadeiro doador de pólen. Em seguida, repetiu-se a simulação de paternidade alterando os níveis de confiança para o restrito de 95% e o relaxado de 85%.

A distância de dispersão contemporânea de pólen foi analisada por meio das atribuições de paternidade das sementes, com o nível de confiança de 95% e 99%. A área efetiva média de vizinhança de polinização (A_{ep}) foi calculada para cada árvore matriz a partir da variância da dispersão de pólen (σ^2), assumindo uma área circular central ao redor da árvore matriz.

$$\widehat{A}_{ep} = 2\pi\sigma^2$$

Na expressão acima, a variância de dispersão de pólen (σ^2) foi estimada a partir da distância entre as árvores matrizes que originaram as sementes e seus respectivos doadores de pólen alocados pela análise de paternidade. Após o conhecimento dos doadores de pólen foi gerada a distribuição de frequência das distâncias de dispersão de pólen pelo programa STATISTICA (Statsoft, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VARIABILIDADE GENÉTICA PRESERVADA NA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA

Para os oito locos analisados, o número médio de alelos foi igual a 11 alelos, variando entre 4 e 20 com um total de 88 alelos presentes nos oito locos avaliados. A amplitude de variação do tamanho dos alelos, em pares de bases, foi verificada entre 103 a 254, considerando todos os locos (Tabela 3). Os valores de heterosigozidade esperada (*He*) e observada (*Ho*), considerando o conjunto de locos foram iguais a 0,646 e 0,423 para todos os locos, em que a heterosigozidade observada foi menor que a esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3). Nas Figuras 5 e 6, pode se observar os perfis eletroforéticos dos locos avaliados. Os iniciadores EMBRA-14 e EMBRA-210 amplificaram um maior número de locos, 20 e 17 alelos, respectivamente.

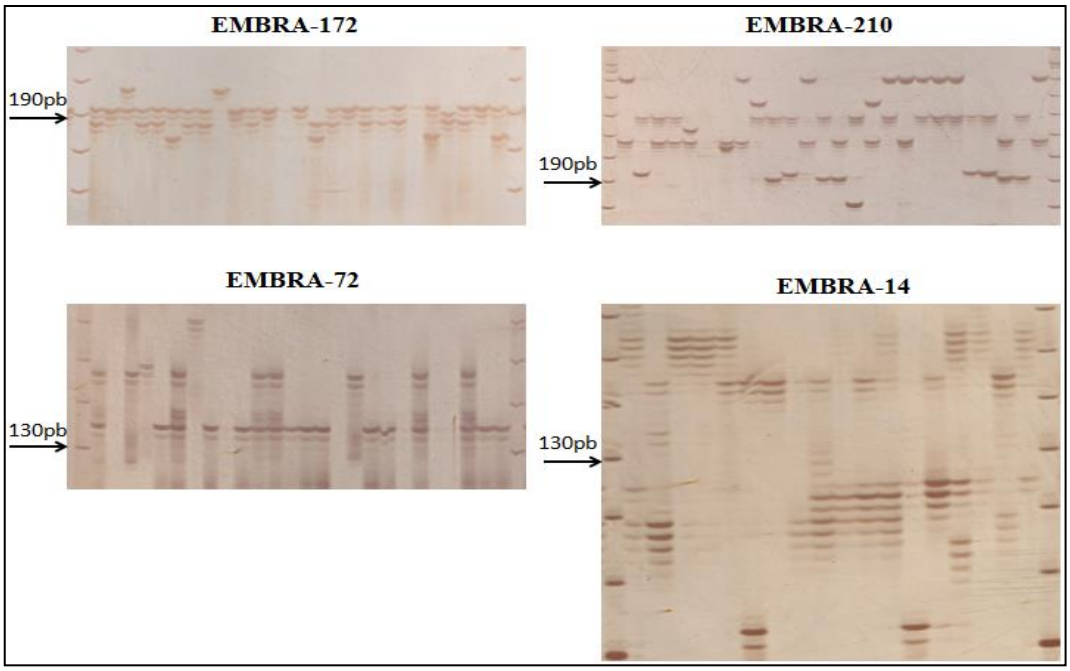

Figura 5. Perfil eletroforético de marcadores microssatélites utilizando iniciadores transferidos de *Eucalyptus* ssp. para *E. dysenterica.*

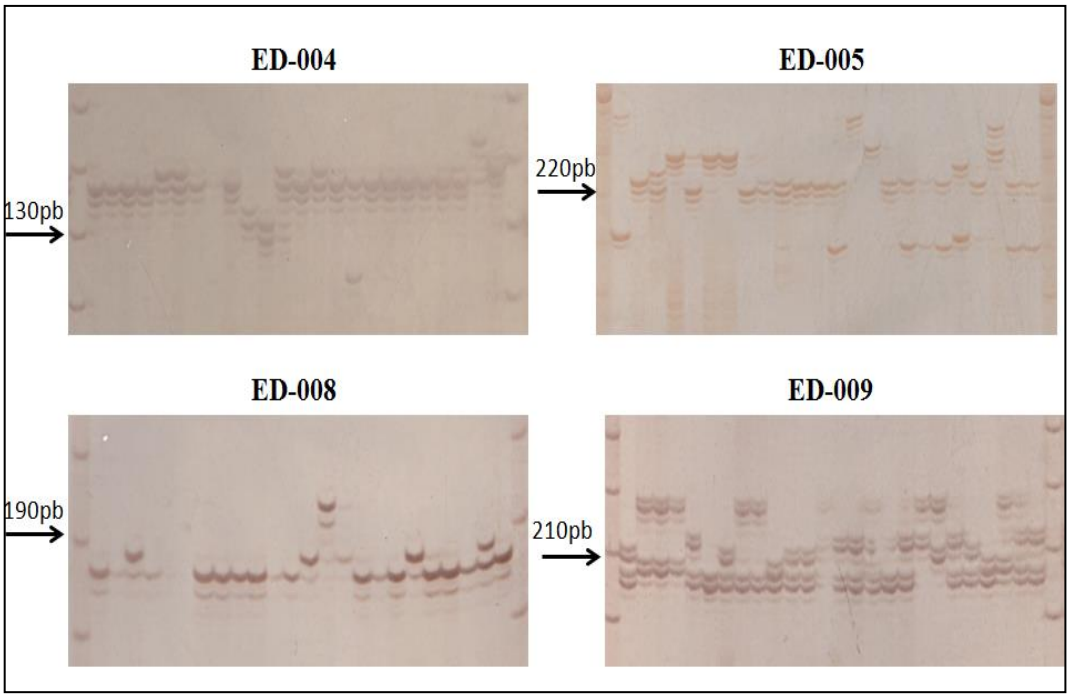

Figura 6. Perfil eletroforético de marcadores microssatélites utilizando iniciadores desenvolvidos para *E. dysenterica.*

Tabela 3. Caracterização da variabilidade genética em locos microssatélites de indivíduos da coleção de germoplasma de *E. dysenterica*. Sendo que, *A* representa o número de alelos; *AM* a amplitude alélica; *He* a heterosigozidade esperada; *Ho* a heterosigozidade observada; *Q* indica à probabilidade de exclusão de paternidade e *I* a probabilidade de identidade genética.

Loco	***A***	***AM***	***He***	***Ho***	***I***	***Q***
ED-004	13	222/266	0,566	0,407	0,211	0,374
ED-005	10	210/240	0,721	0,545	0,102	0,530
ED-008	4	186/196	0,327	0,082	0,485	0,161
ED-009	7	206/218	0,748	0,611	0,105	0,519
EMBRA-14	20	103/167	0,827	0,453	0,042	0,690
EMBRA-72	9	135/175	0,421	0,123	0,347	0,262
EMBRA-172	8	182/208	0,713	0,510	0,118	0,493
EMBRA-210	17	180/254	0,843	0,655	0,042	0,694
Média	11	-	0,646	0,423	$IC = 7{,}956 \times 10^{-8}$	$QC = 0{,}99579$

Adicionalmente, a probabilidade de exclusão (*Q*) variou entre 0,161 e 0,694, apresentando um valor combinado igual a 0,99579, que pode ser considerado de moderado a alto (Collevatti et al., 1999; Moreira et al., 2009) (Tabela 3). Por se tratar de um valor que mede o poder de exclusão de paternidade, o valor ideal seria de 0,99999 (Collevatti et al., 1999; Collevatti et al., 2001; Braga et al., 2007), entretanto, esse valor de 0,99579 pode ser considerado pertinente para análises de estrutura genética espacial e de distância de

fluxo gênico via pólen utilizando atribuição de paternidade (Braga et al., 2007). Para o conjunto de locos analisados a probabilidade de identidade combinada foi de $7{,}9x10^{-5}$, valor considerado bom para este tipo de análise, por isso a probabilidade de identidade combinada deve ser praticamente nula para demonstrar que o microssatélite é um ótimo marcador para discriminar indivíduos (Collevatti et al., 1999).

Esses resultados demonstram que os locos avaliados apresentaram um nível moderado de polimorfismo. Esse valor de polimorfismo encontrado para *E. dysenterica* foi menor que o encontrado para outras espécies nativas do Cerrado também estudadas com microssatélites, como por exemplo, em *Tabebuia aurea* - média de 36 alelos por loco (Braga et al., 2007); *Annona crassiflora* – média de 13,8 alelos por loco (Pereira et al., 2008); *Caryocar brasiliense* – média de 16,1 alelos por loco (Collevatti et al., 1999); *Eugenia uniflora* – média de 14,4 alelos por loco (Ferreira et al., 2008). Entretanto, o polimorfismo encontrado neste trabalho para *E. dysenterica* foi maior, quando comparado com outras espécies do Cerrado, tais como: *Lychnophora ericoides* – média de 8,6 alelos por média (Rabelo et al., 2011); *Dipteryx alata* – média de 4,3 alelos por loco (Soares et al., 2012); *Tibouchina papyrus* – média de 3,4 alelos por loco (Telles et al., 2011); *Tabebuia roseo-alba* – média de 8,9 alelos por loco (Feres et al., 2009); *Solanum lycocarpum* – média de 5,9 alelos por loco (Martins et al., 2006).

Os oito locos microssatélites utilizados neste estudo apresentaram um nível moderado de polimorfismo nas duas gerações de indivíduos de *E. dysenterica* analisados. A geração de adultos, conforme citado anteriormente, apresentou entre 4 e 20 alelos por loco (média igual a 11 alelos) e, na geração seguinte (progênies) quase todos os alelos foram representados, porém, com uma média de alelos um pouco menor, igual a 10,5. Essa queda se deve ao fato de cinco alelos não terem sido repassados para as progênies estudadas (Figuras 7 e 8).

Os quatro locos de microssatélites desenvolvidos para *E. dysenterica* pela técnica de "*shotgun*" (Tuskan et al., 2004; Burgess et al., 2006; Soares et al., 2012) apresentaram um baixo polimorfismo, quando comparado com os transferidos. O número de alelos nesses locos variou entre 4 e 13 (Figura 7). Os alelos 252 e 266 pb, no loco ED-005 ocorreram somente nos indivíduos adultos. Para os locos microssatélites desenvolvidos para eucalipto e transferidos para cagaiteira, o polimorfismo foi superior, com um número de alelos por loco variando entre 8 e 20. Deste conjunto, três alelos também foram exclusivos para os indivíduos adultos (Figura 8). Esses resultados sugerem

que a geração das progênies estudadas, apesar de um menor polimorfismo, representa grande parte (94,3%) da variabilidade genética da coleção de germoplasma, considerando os locos avaliados.

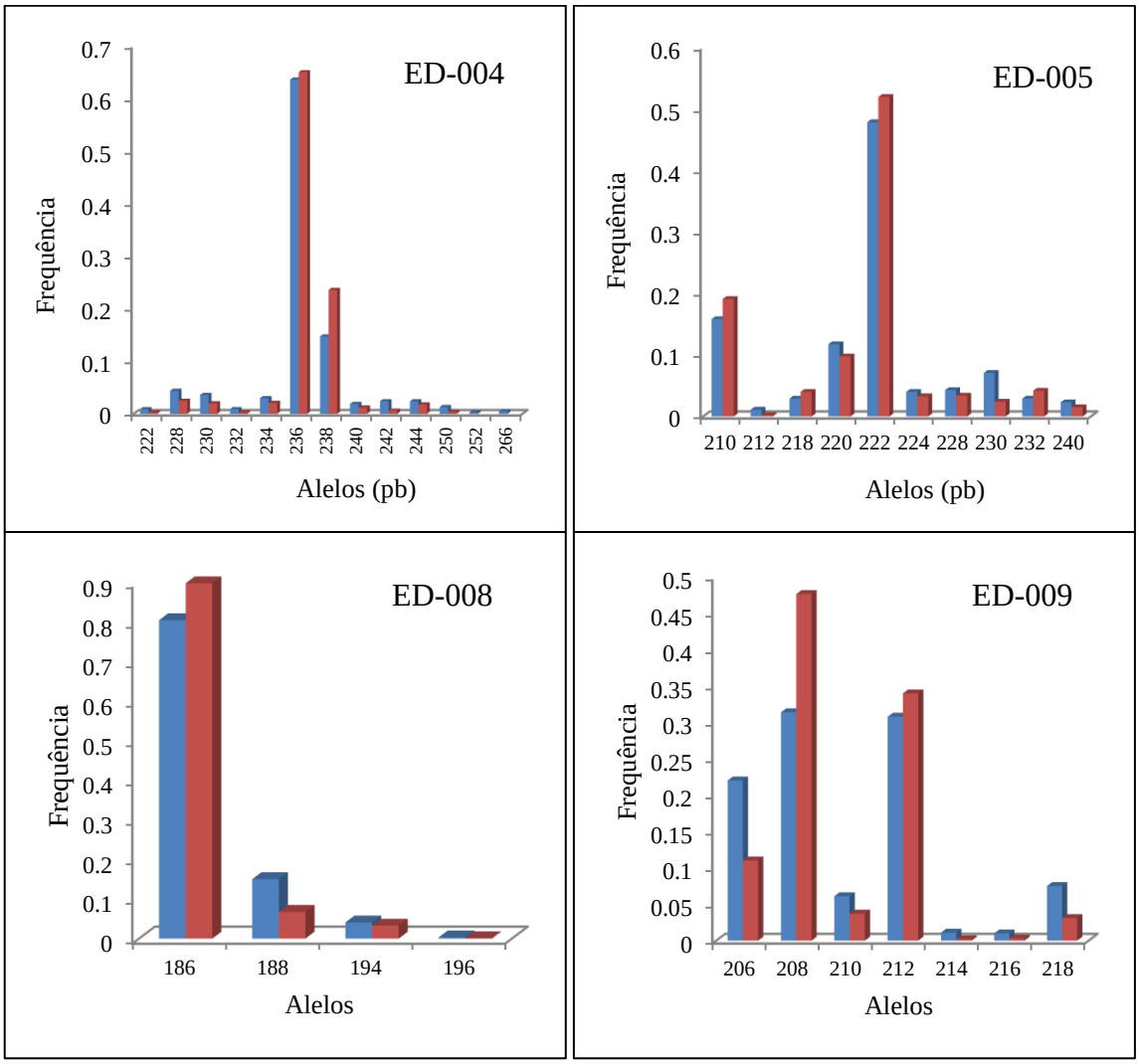

Figura 7. Distribuição das frequências alélicas encontradas para os quatro locos microssatélites desenvolvidos para *E. dysenterica*. As barras azuis representam as frequências alélicas dos indivíduos adultos da coleção de germoplasma, as vermelhas representam as frequências nas progênies.

Em um trabalho realizado com cagaiteira por Zucchi (2002), nas dez populações de *E. dysenterica*, que deram origem a essa coleção de germoplasma, foi observado um nível de variação genética de moderada a alta em todos os locos avaliados, semelhante aos verificados neste trabalho. O número médio de alelos foi igual a 10,4 e a heterosigozidade média esperada foi igual a 0,442, maior que a encontrada por Telles et al.

(2001) em estudo similar com as mesmas populações de cagaiteira, porém utilizando marcadores isoenzimáticos. Esses resultados, quando comparados com os resultados obtidos neste trabalho, evidenciam que a variação genética presente nas populações naturais se mantém preservada na coleção de germoplasma, uma vez que os cruzamentos estão ocorrendo de forma a manter a variabilidade genética existente.

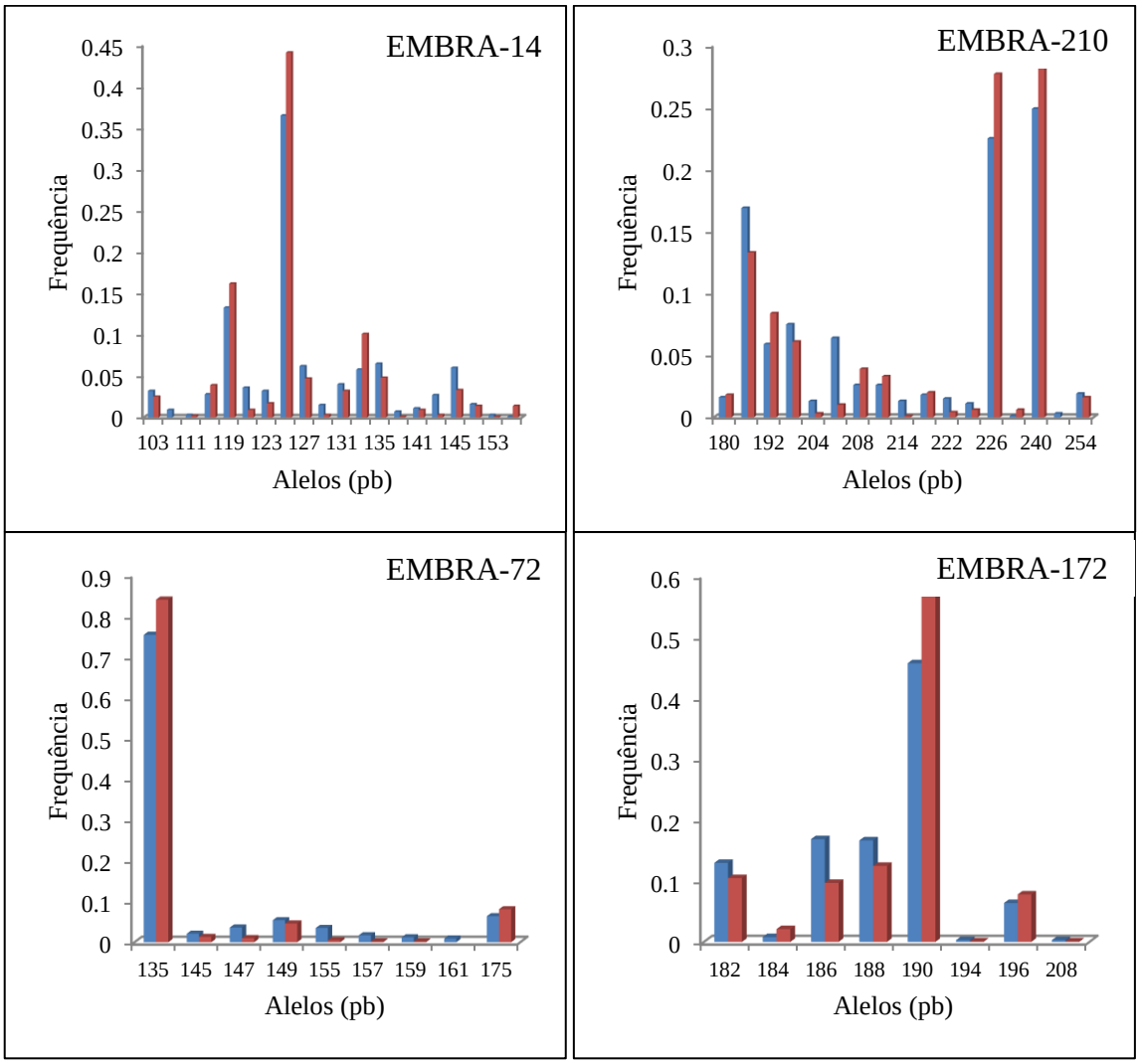

Figura 8. Distribuição das frequências alélicas encontradas para os quatro locos microssatélites desenvolvidos para *Eucalyptus* spp. e transferidos para *E. dysenterica*. As barras azuis representam as frequências alélicas dos indivíduos adultos da coleção de germoplasma, as vermelhas representam as frequências nas progênies.

O conhecimento dos níveis de variação genética em espécies vegetais nativas do Cerrado tem implicações imediatas sobre as estratégias ótimas de amostragem de indivíduos ou populações, na conservação e manutenção da diversidade genética do

germoplasma tanto *in situ* quanto *ex situ* (Karasawa, 2009). Isto é particularmente verdadeiro para a *E. dysenterica*, considerando que a espécie já apresenta uma coleção de germoplasma bem estabelecida, em que, se preserva indivíduos de dez populações naturais da região sudeste do Estado de Goiás.

4.2 SISTEMA REPRODUTIVO

4.2.1 Frequências alélicas nos óvulos e pólen

As frequências alélicas nos gametas femininos e masculinos apresentaram divergências ao nível de 1% para a maioria dos locos avaliados, com exceção de apenas dois locos, ED-004 e Ed-008 (Tabela 4). Dessa forma, pode-se afirmar que o *pool* de pólen da coleção representa as frequências alélicas dos doadores de pólen, sugerindo, assim, a existência de equilíbrio entre as gerações para esses dois locos. Esses resultados já eram esperados, pois, esses locos apresentam poucos alelos muito frequentes, e baixa heterosigozidade (Oliveira et al., 2002).

A homogeneidade nas frequências alélicas do pólen e do óvulo é uma das pressuposições do modelo misto de reprodução de Ritland & Jain (1981). Contudo, segundo esses autores, quando se analisam mais de quatro ou cinco locos, a violação quanto à pressuposição de homogeneidade das frequências alélicas do pólen e óvulo tem pouco efeito sobre a estimativa da taxa de cruzamento multiloco na população.

Sebbenn et al. (2000) e Seoane et al. (2005) afirmaram que as causas dos desvios entre as frequências alélicas do pólen e dos óvulos podem estar associadas à diferenças relativas entre as funções masculinas e femininas das plantas, imigração de pólen de outras populações, assincronismo no florescimento das árvores, hábitos dos polinizadores, cruzamentos aparentados ou, mais provavelmente, devido a cruzamentos correlacionados ou por efeito de amostragem.

Diversos estudos têm detectado divergências significativas entre as frequências de pólen e óvulo, em espécies arbóreas tropicais, tais como: *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 2001); *Tabebuia roseo-alba* (Feres, 2009); *Solanum lycocarpum* (Martins et al., 2006); *Eremanthus erythropappus* (Barreira et al., 2006); *Senna multijuga* (Ribeiro & Lovato, 2004); *Acacia aroma* e *Acacia macracantha* (Casiva et al., 2004).

Tabela 4. Divergência genética ($\hat{F}_{ST}$) entre as frequências alélicas do pólen e dos óvulos nas progênies de *E. dysenterica.*

Locos	Alelos	Pólen	Óvulo	F_{ST}	GL	χ^2	Valor de p
ED-004	236	0,622	0,652				
	238	0,238	0,261				
	234	0,031	0,022				
	244	0,037	0				
	222	0,006	0				
	240	0,008	0,022				
	242	0,013	0				
	228	0,027	0,022				
	232	0,006	0				
	250	0,008	0				
	230	0,004	0,022	0,0018	10	18,43	0,0481
ED-005	222	0,419	0,565				
	210	0,237	0,174				
	232	0,021	0,065				
	220	0,118	0,109				
	218	0,083	0				
	240	0,031	0				
	228	0,024	0,043				
	224	0,028	0,022				
	230	0,036	0,022				
	212	0,004	0	0,0128	9	118,31*	$2,96x10^{-21}$
ED-008	186	0,915	0,891				
	194	0,026	0,043				
	188	0,057	0,065				
	196	0,002	0	0,0013	3	3,98	0,2627
ED-009	208	0,337	0,543				
	212	0,444	0,304				
	210	0,04	0,043				
	206	0,157	0,043				
	216	0,006	0				
	218	0,013	0,065				
	214	0,004	0	0,0298	6	182,92*	$8,13x10^{-37}$
EMBRA-14	125	0,42	0,391				
	135	0,059	0,065				
	133	0,078	0,13				
	115	0,029	0,065				
	127	0,053	0,043				
	119	0,15	0,174				
	147	0,016	0,022				
	123	0,033	0				
	129	0,006	0				
	131	0,052	0,022				
	145	0,026	0,043				
	155	0,01	0,022				
	121	0,019	0				
	141	0,019	0				
	111	0,004	0				
	139	0,002	0				
	143	0,006	0				
	103	0,018	0,022				
	153	0,002	0	0,0028	18	51,85*	$3,95x10^{-5}$

Continua...

Continuação

Locos	Alelos	Pólen	Óvulo	FST	GL	χ2	*Valor de p*
EMBRA-72	135	0,84	0,804				
	157	0,004	0				
	175	0,069	0,13				
	161	0,002	0				
	147	0,008	0,022				
	133	0,002	0				
	149	0,035	0,043				
	145	0,027	0				
	155	0,01	0				
	159	0,004	0	0,0049	9	45,16*	$8,05x10^{-7}$
EMBRA-172	190	0,528	0,587				
	188	0,125	0,13				
	182	0,143	0,065				
	196	0,111	0,065				
	186	0,085	0,109				
	184	0,006	0,043				
	208	0,002	0	0,0053	6	32,55*	$1,28x10^{-5}$
EMBRA-210	226	0,27	0,304				
	240	0,288	0,304				
	212	0,02	0,043				
	190	0,144	0,109				
	192	0,067	0,087				
	202	0,093	0,022				
	180	0,037	0				
	254	0,016	0,022				
	206	0,021	0				
	224	0,012	0				
	208	0,01	0,065				
	218	0,009	0,022				
	204	0,006	0				
	214	0,002	0				
	222	0,008	0				
	232	0	0,022	0,0045	15	68,92*	$6,94x10^{-9}$

Provavelmente os desvios nas frequências alélicas do pólen e dos óvulos dos indivíduos de *E. dysenterica* da coleção de germoplasma devem ter sido causados por vários fatores. É importante ressaltar aqui, que as 24 matrizes amostradas na coleção de germoplasma não tem representantes de todas as populações naturais. Pode-se observar na Tabela 5 que não foram amostradas matrizes das populações naturais 4 (Três Ranchos), 6 (Campo Alegre) e 9 (Goiânia). A ausência de matrizes que representam essas populações se deve basicamente ao florescimento e à frutificação tardia desses indivíduos na coleção de germoplasma. Dessa forma, é possível afirmar que o efeito da amostragem pode ser um dos principais fatores que influenciaram nos desvios das frequências alélicas. No entanto, identificar o fator que mais interferiu nos desvios e ainda quantificá-lo é importante.

4.2.2 Taxas de cruzamento

As taxas de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$) e uniloco ($\hat{t}_s$) foram altas e significativamente diferentes da unidade em todas as famílias (Tabela 5). A estimativa da diferença entre a taxa de cruzamento multiloco e uniloco $(t_m - t_s)$ combinada para todas as famílias analisadas também foi positiva e significativa (Tabela 6), indicando a ocorrência de 10,9% ($t_m - t_s = 0{,}109$) de cruzamento entre indivíduos aparentados.

Essas baixas taxas indicam que os indivíduos de *E. dysenterica* da coleção de germoplasma estão se reproduzindo predominantemente por fecundação cruzada. Estes resultados corroboram com aqueles encontrados por Zucchi, (2003) e Telles (2003) para a mesma espécie. Além disso, a diferença entre a taxa de cruzamento multiloco e uniloco tem sido utilizada para quantificar a ocorrência de endogamia biparental ou, em outros termos, o cruzamento entre indivíduos aparentados (Lee, 2000; Ritland, 2002). Essa pequena frequência de fecundação cruzada entre parentes na coleção de germoplasma era esperado, uma vez que, os indivíduos amostrados na coleção são provenientes de dez localidades diferentes do Estado de Goiás e foram plantadas no esquema experimental de blocos casualizados.

Tabela 5. Taxa de cruzamento multiloco (t_m) e uniloco (t_s) por família.

Família	População	N	t_m	t_s	t_m-t_s
20.1	2 (Catalão)	20	1	0,817	0,183
76.1	7 (Cristalina)	25	1	0,825	0,175
40.1	5 (Campo Alegre)	25	0,927	0,747	0,18
17.1	2 (Catalão)	26	1	0,894	0,106
43.1	5 (Campo Alegre)	25	1	1	0
21.1	2 (Catalão)	20	1	0,899	0,101
1.2	1 (Catalão)	26	0,962	0,921	0,041
28.2	3 (Catalão)	25	0,961	0,895	0,066
24.2	2 (Catalão)	15	1	0,899	0,101
34.2	3 (Catalão)	25	0,89	0,704	0,186
78.2	7 (Cristalina)	25	0,97	1	-0,03
81.2	8 (Luziânia)	25	0,965	0,897	0,068
3.3	1 (Catalão)	20	0,953	1	-0,047
40.3	5 (Campo Alegre)	25	1	1	0
76.3	7 (Cristalina)	25	0,882	0,675	0,207
24.3	2 (Catalão)	44	0,988	0,995	-0,007
73.3	7 (Cristalina)	31	0,923	1	-0,077
108.4	10 (Senador Canedo)	26	0,846	0,922	-0,076
27.4	3 (Catalão)	17	1	1	0
31.4	3 (Catalão)	15	0,935	0,811	0,124
112.4	10 (Senador Canedo)	18	0,833	0,514	0,319
76.4	7 (Cristalina)	21	1	0,891	0,109
44.4	5 (Campo Alegre)	18	0,889	0,773	0,116

Assumindo o equilíbrio de endogamia de Wright, a endogamia esperada (F_e), a partir da taxa de autofecundação foi igual a 0,022. Assim, aproximadamente 19,81% $[(0{,}022/0{,}111)x100)]$ da endogamia observada nas progênies pode ser explicada pela taxa de autofecundação e o restante pela fecundação cruzada entre parentes.

A taxa de cruzamento em plantas hermafroditas, como *E. dysenterica*, depende de fatores tais como a presença e intensidade de auto-incompatibilidade; grau de protogenia e protandria; comportamento de forrageiro dos polinizadores entre e dentro de árvores, o qual é influenciado pela densidade de florescimento na população e; aborto seletivo de frutos e sementes de autofecundação (Murawski & Hamrick, 1991). No entanto, estudos que testem a influência desses fatores nas taxas de cruzamento de *E. dysenterica* ainda são carentes, embora, extremamente necessários.

Tabela 6. Parâmetros de endogamia e sistema reprodutivo em *E. dysenterica*.

Parâmetros	**Estimativas (SD)***
Número total de árvores matrizes (m)	23
Número total de progênies (n)	542
Endogamia nos parentais	0,018 (0,049)
Endogamia nas progênies	0,111
Endogamia no equilíbrio de Wrigth (F_e)	0,022
Taxa de cruzamento multiloco (t_m)	0,957 (0,012)
Taxa de cruzamento uniloco (t_s)	0,848 (0,041)
Taxa de cruzamento entre parentes ($t_m - t_s$)	0,109 (0,033)
Correlação de autofecundação (r_s)	-0,962 (0,175)
Correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$)	0,119 (0,067)
Coeficiente de coancestria (θ_{xy})	0,146
Cruzamentos envolvendo árvores polinizadoras parentes ($r_{p(s)} - r_{p(m)}$)	0,064 (0,077)
Número médio de árvores doadores ($N_{ep} = 1/r_{p(m)}$)	8,85
Proporão de irmãos-germanos ($P_{IC} = r_p t_m$)	0,107
Proporão de meios-irmãos ($P_{MI} = t_m(1-r_p)$)	0,847
Proporção de irmãos de autofecundação ($P_{IA} = 1-t_m$)	0,046

* Entre parênteses está o erro padrão da média

A estimativa da correlação de autofecundação, ou a probabilidade de encontrar um indivíduo gerado por autofecundação onde foi encontrado outro indivíduo de autofecundação foi negativa $(\hat{r}_s = -0{,}962)$ (Tabela 6). Correlações significativas de autofecundação justificam as variações na taxa de cruzamento individual (Tabela 5). Sendo assim, embora a taxa de cruzamento multiloco tenha sido alta e próxima a uma unidade, se existir sistema de auto-incompatibilidade na espécie, existe variação genética para este sistema e algumas plantas podem se autofecundar com maior taxa do que outras. Essas variações têm sido relatadas em *Mimosa scabrella* (Sobierajski et al., 2006); *Shorea*

congestiflora (Murawski et al., 1994); *Eremanthus erythropappus* (Barreira et al., 2006); *Tabebuia roseo-alba* (Feres, 2009).

A correlação de paternidade, que mede a proporção de indivíduos gerados por cruzamentos biparentais (irmãos-completos), foi baixa $(\hat{r}_p = 0{,}119)$ sugerindo que em média 11,9% dos indivíduos das progênies são filhos do mesmo doador de pólen. Esses resultados sugerem que o número de polinizadores de *E. dysenterica* não é restrito e que também pode haver paternidade múltipla entre sementes do mesmo fruto e/ou entre frutos de uma mesma matriz (Tabela 6). A partir das correlações de paternidade, foi possível ainda estimar o número médio de indivíduos que efetivamente polinizaram as matrizes, que foi igual a 8,85.

Combinando as estimativas de $\hat{t}_m$ e $\hat{r}_p$ foi possível conhecer a proporção dos diferentes tipos de progênies na descendência da coleção de germoplasma de *E. dysenterica*. Em média 10,79% das progênies analisadas foram originadas por cruzamentos biparentais, sendo aparentados no grau de irmãos germanos, e que a grande maioria delas (84,70%) foi formada por fecundação cruzada, sendo aparentados no grau de meios-irmãos. Além disso, pode-se afirmar que somente 4,6% das progênies foram formadas por autofecundação. As estimativas indicando cruzamentos entre indivíduos aparentados e cruzamentos biparentais não surpreende, uma vez que se trata de uma coleção de germoplasma *in vivo*, em que os indivíduos amostrados estão distantes uns dos outros em apenas seis metros.

Essas proporções constituem-se mais evidências de que a *E. dysenterica* é uma espécie que apresenta sistema reprodutivo misto, combinando autofecundação e fecundação cruzada, com predomínio de cruzamentos aleatórios. Estimativas de taxa aparente de fecundação cruzada, com uso de marcadores moleculares e enzimáticos, confirmam a predominância de alogamia na espécie *E. dysenterica*. A partir dos dados isoenzimáticos foi estimada uma taxa de cruzamento igual a de 83,5% (Telles et al., 2003), enquanto para dos dados de microssatélites a taxa estimada foi igual a de 100% (Zucchi et al., 2003).

4.2.3 Parentesco e tamanho efetivo de variância

O coeficiente médio de coancestria dentro de progênies foi estimado em 0,146, ou seja, 17,32% superior ao esperado em progênies de meios-irmãos (0,125) (Tabela 6).

Em concordância com as estimativas da correlação de paternidade, esse valor indica que os cruzamentos biparentais e autofecundações estão ocorrendo na coleção de germoplasma, mas com baixa frequência.

O coeficiente de coancestria tem papel importante em programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos, na estimativa do coeficiente de correlação de parentesco entre plantas dentro de progênies e tamanho efetivo de variância. Esse coeficiente é a base para o cálculo da variação genética aditiva e para o coeficiente de herdabilidade e ganho de seleção (Sebbenn et al., 2000; Seoane et al., 2005; Barreira et al., 2006). Dessa forma, em coleções em que as progênies são perfeitamente de meios-irmãos o coeficiente de parentesco estima 25% da variação genética aditiva (Ritland, 1989; Sebbenn et al., 2002; Gusson et al., 2006). Assim, para a estimativa da variância genética aditiva e de parâmetros genéticos a partir de caracteres quantitativos em progênies da coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, o ideal seria usar o coeficiente de parentesco igual a 0,292 $\left(\hat{r}_{xy} = 2\hat{\theta}_{xy}\right)$, ao invés de 0,25, caso contrário as estimativas serão superestimadas. Coeficientes de coancestria semelhantes foram detectados em outras espécies tropicais: 0,289 para *Calophyllum brasiliense* (Souza, 2006); 0,253 para *Ilex paraguariensis* (Wendt et al., 2009) e 0,138 para *Solanum lycocarpum* (Martins et al., 2006).

O valor estimado para o tamanho efetivo de variância $\left(\widehat{N}_{e(v)}\right)$, que mede a representatividade genética de uma população, em função de alterações nas frequências alélicas entre gerações devido a efeitos de deriva genética no processo de reprodução, para a coleção de *E. dysenterica* foi de 3,42. Este valor está bem próximo do valor teórico máximo esperado (aproximadamente 4) em uma progênie de uma população referencial ideal, ou seja, de tamanho infinito praticando cruzamentos aleatórios, sem seleção, mutação, deriva genética e migração.

A estimativa do tamanho efetivo de variância é particularmente importante quando se pensa em manejo de uma coleção de germoplasma para a conservação genética *ex situ*, início de um programa de melhoramento e coleta de sementes para a recuperação ambiental (Sebbenn et al., 2000; Barreira et al., 2006). Diante de tais situações deseja-se reter um determinado tamanho efetivo que permita a manutenção da diversidade genética por um certo período de tempo ou vários ciclos de seleção recorrente. Por exemplo, para a conservação de espécies frutíferas do Cerrado, como a cagaiteira, por suas características de vida longa e sobreposição de gerações, deve-se procurar reter um tamanho efetivo de

pelo menos 100. Assim, dividindo o tamanho efetivo alvo do programa (conservação, melhoramento ou coleta de sementes para recuperação ambiental) pelo tamanho efetivo de variância de uma simples progênie, é possível determinar o número de árvores necessárias para a coleta de sementes. Neste caso a coleta de sementes em aproximadamente 30 $(100/3{,}42)$ árvores matrizes garantiria a retenção do tamanho efetivo alvo de 100 desde que o número de sementes de cada genitor tenda ao infinito.

4.3 ANÁLISE DE PATERNIDADE E DISTÂNCIA DE DISPERSÃO DE PÓLEN

Das 542 sementes coletadas na coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, foi possível determinar o doador de pólen para 304 sementes, ou seja, em 56% dos indivíduos o Δ *score* foi superior ao Δ crítico no nível de 85% de probabilidade. Destes, 171 (32%) sementes apresentam o Δ *score* superior ao Δ crítico no nível de 95% e 92 (17%) superior ao Δ crítico no nível de 99% de probabilidade (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Resultado do teste de paternidade realizado na coleção de germoplasma de *E. dysenterica.*

Semente	Matriz	Doador de Pólen	Trio LOD score	Trio Delta	Nível de Confiança	Distância de dispersão (m)
13(1.2)	1.2M	24.2M	11,90	8,44	*	18,00
4(112.4)	1.2M	1.2M	6,78	4,15	+	0,00
1(108.4)	108.4M	111(B4)	15,90	6,97	*	12,00
12(40.1)	108.4M	98(B1)	19,20	15,60	*	188,40
12(76.1)	108.4M	94(B4)	24,20	15,90	*	21,63
14(81.2)	108.4M	85(B4)	15,10	15,10	*	36,50
17(76.4)	108.4M	93(B3)	13,40	7,63	*	67,08
19(34.2)	108.4M	6(B4)	5,74	4,97	+	18,97
20(108.4)	108.4M	108.4M	10,30	6,11	*	0,00
5(108.4)	108.4M	61(B1)	9,99	6,87	*	216,75
6(1.2)	108.4M	108.4M	14,70	10,00	*	0,00
7(112.4)	108.4M	108.4M	7,85	4,31	+	0,00
7(78.2)	108.4M	75(B3)	10,60	6,07	*	49,48
9(20.1)	108.4M	111(B4)	15,90	6,97	*	12,00
1(40.1)	112.4M	99(B2)	15,00	15,00	*	102,70
12(112.4)	112.4M	99(B1)	19,70	19,20	*	204,09
13(112.4)	112.4M	26(B4)	15,50	10,30	*	30,00
14(43.1)	112.4M	26(B4)	19,10	7,00	*	30,00
15(112.4)	112.4M	26(B4)	19,10	7,00	*	30,00
16(108.4)	112.4M	112.4M	8,21	8,21	*	0,00
17(112.4)	112.4M	83(B1)	21,00	20,60	*	223,29
18(112.4)	112.4M	112.4M	15,00	14,60	*	0,00
22(34.2)	112.4M	112.4M	14,80	14,80	*	0,00
3(112.4)	112.4M	112.4M	17,50	10,50	*	0,00

Continua...

Continuação...

Semente	Matriz	Doador de Pólen	Trio LOD score	Trio Delta	Nível de Confiança	Distância de dispersão (m)
4(20.1)	112.4M	87(B1)	6,70	6,70	*	175,65
4(76.3)	112.4M	86(B2)	9,97	9,33	*	108,66
5(112.4)	112.4M	99(B4)	7,15	5,70	+	8,49
5(78.2)	112.4M	111(B4)	17,10	11,20	*	13,42
14(78.2)	12.1M	76.1M	10,50	8,73	*	36,50
15(12.1)	12.1M	75(B4)	9,91	5,14	+	183,56
16(112.4)	12.1M	2(B1)	5,70	4,72	+	37,95
16(44.4)	12.1M	1.2M	5,31	4,47	+	64,62
18(12.1)	12.1M	28(B4)	10,60	6,60	*	216,08
18(20.1)	12.1M	7(B1)	6,23	5,20	+	51,26
25(73.3)	12.1M	7(B1)	7,86	4,56	+	51,26
7(76.4)	12.1M	34(B1)	8,12	5,71	+	38,42
5(17.1)	17.1M	22(B1)	6,04	4,07	+	19,70
6(3.3)	17.1M	44(B1)	6,92	5,28	+	54,59
7(108.4)	17.1M	36(B1)	8,27	5,50	+	58,82
9(17.1)	17.1M	81.2M	5,58	4,24	+	129,03
15(108.4)	20.1M	63(B4)	5,58	4,05	+	200,26
15(73.3)	20.1M	1.2M	7,42	6,28	*	78,23
2(108.4)	20.1M	78(B1)	8,78	5,90	+	12,00
3(12.1)	20.1M	12(B2)	12,70	12,70	*	56,92
6(108.4)	20.1M	38(B1)	5,65	4,05	+	18,97
1(81.2)	24.2M	33(B3)	8,03	6,38	*	61,19
11(44.4)	24.2M	80(B3)	11,50	11,50	*	64,62
15(31.4)	24.2M	28.2M	6,07	4,69	+	36,50
34(24.3)	24.2M	33(B3)	7,83	6,38	*	61,19
4(24.2)	24.2M	84(B2)	13,50	13,50	*	16,97
1(34.2)	24.3M	89(B4)	8,66	6,83	*	85,91
13(12.1)	24.3M	25(B3)	8,87	5,68	+	36,00
13(73.3)	24.3M	89(B4)	8,66	6,83	*	85,91
13(78.2)	24.3M	45(B4)	8,42	6,97	*	83,57
19(78.2)	24.3M	45(B4)	8,42	6,97	*	83,57
25(40.3)	24.3M	2(B1)	10,50	6,58	*	144,12
42(24.3)	24.3M	87(B2)	7,75	7,75	*	68,41
5(76.3)	24.3M	32(B1)	7,03	4,72	+	114,00
11(112.4)	27.4M	85(B2)	9,33	9,33	*	108,66
5(27.4)	27.4M	75(B4)	9,89	5,14	+	26,83
16(76.4)	28.2M	4(B2)	8,98	5,73	+	36,50
31(24.3)	28.2M	14(B4)	7,11	5,41	+	126,14
1(3.3)	3.3M	14(B3)	11,09	8,20	*	32,31
10(24.2)	3.3M	36(B3)	6,84	4,88	+	34,99
11(12.1)	3.3M	111(B3)	19,21	4,54	+	72,99
16(34.2)	3.3M	82(B3)	10,68	10,68	*	36,50
18(3.3)	3.3M	27(B2)	6,05	4,70	+	26,83
18(81.2)	3.3M	26(B4)	19,77	12,41	*	93,15
2(24.3)	3.3M	102(B3)	18,51	17,33	*	60,00
2(3.3)	3.3M	104(B3)	20,94	15,92	*	21,63
23(78.2)	3.3M	102(B3)	18,51	17,33	*	60,00
25(34.2)	3.3M	13(B3)	8,25	4,73	+	48,37
3(3.3)	3.3M	3.3M	6,35	6,04	*	0,00
5(12.1)	3.3M	111(B3)	19,21	4,54	+	72,99
5(40.1)	3.3M	104(B4)	20,55	13,66	*	126,57
10(44.4)	31.4M	9(B3)	6,75	4,45	+	66,27
20(43.1)	31.4M	101(B4)	9,66	6,60	*	43,68
11(108.4)	34.2M	64(B1)	6,65	4,99	+	42,00

Continua...

Continuação...

Semente	Matriz	Doador de Pólen	Trio LOD score	Trio Delta	Nível de Confiança	Distância de dispersão (m)
13(17.1)	34.2M	2(B1)	9,00	4,87	+	80,05
13(34.2)	34.2M	8(B2)	7,12	4,52	+	21,63
18(73.3)	34.2M	90(B2)	9,09	6,61	*	18,97
2(76.1)	34.2M	89(B2)	15,00	15,00	*	6,00
5(76.1)	34.2M	64(B1)	10,00	8,09	*	42,00
1(112.4)	40.1M	89(B4)	7,95	5,14	+	190,68
11(27.4)	40.1M	40.3M	8,26	6,59	*	107,33
15(40.1)	40.1M	89(B4)	8,05	5,14	+	190,68
4(12.1)	40.1M	15(B2)	7,80	5,49	+	34,99
8(76.3)	40.1M	47(B3)	6,85	4,91	+	118,19
15(76.4)	40.3M	99(B4)	7,14	5,07	+	87,36
15(81.2)	40.3M	91(B1)	9,27	4,96	+	136,82
8(76.1)	40.3M	57(B1)	9,80	7,10	*	132,54
10(43.1)	43.1M	33(B4)	7,70	4,32	+	181,59
11(17.1)	43.1M	75(B1)	11,00	6,87	*	37,95
11(43.1)	43.1M	75(B1)	9,96	4,74	+	37,95
12(43.1)	43.1M	20.1M	7,74	5,50	+	24,00
16(3.3)	43.1M	62(B3)	9,41	7,68	*	120,15
16(43.1)	43.1M	64(B1)	8,58	5,72	+	18,00
20(3.3)	43.1M	76(B2)	7,88	6,64	*	30,59
23(43.1)	43.1M	85(B1)	6,54	4,54	+	8,49
3(40.1)	43.1M	58(B1)	10,70	6,03	*	38,42
6(12.1)	43.1M	76(B2)	7,44	5,55	+	30,59
7(43.1)	43.1M	87(B1)	11,30	6,59	*	30,00
8(43.1)	43.1M	87(B1)	11,40	6,59	*	30,00
9(3.3)	43.1M	76(B2)	8,18	6,64	*	30,59
1(44.4)	44.4M	44.4M	12,70	12,70	*	0,00
10(31.4)	44.4M	106(B3)	11,10	11,10	*	84,85
13(44.4)	44.4M	44.4M	12,70	12,70	*	0,00
17(44.4)	44.4M	104(B4)	19,10	10,80	*	12,00
18(44.4)	44.4M	100(B4)	23,00	17,50	*	6,00
18(78.2)	44.4M	106(B3)	6,77	6,70	*	84,85
19(43.1)	44.4M	111(B4)	14,10	11,10	*	45,69
37(24.3)	44.4M	77(B4)	11,90	11,90	*	30,00
5(24.2)	44.4M	106(B3)	18,20	18,20	*	84,85
5(24.3)	44.4M	100(B2)	21,90	21,30	*	150,00
5(3.3)	44.4M	108.4M	5,51	5,51	+	53,67
8(78.2)	44.4M	106(B3)	14,80	14,80	*	84,85
9(44.4)	44.4M	100(B4)	23,00	17,30	*	12,00
2(40.3)	73.3M	87(B1)	7,46	6,18	*	90,80
23(73.3)	73.3M	52(B2)	4,87	4,87	+	78,23
27(73.3)	73.3M	45(B4)	8,41	6,39	*	100,58
7(24.2)	73.3M	87(B2)	8,92	4,43	+	55,32
8(112.4)	73.3M	72(B4)	7,86	5,02	+	100,58
9(78.2)	73.3M	87(B2)	7,16	6,03	*	55,32
12(108.4)	76.1M	78(B1)	5,45	5,45	+	21,63
14(44.4)	76.1M	12.1M	8,19	4,49	+	36,50
16(40.3)	76.1M	89(B3)	11,30	5,59	+	121,34
22(108.4)	76.1M	60(B1)	7,90	6,27	*	37,95
24(34.2)	76.1M	91(B1)	4,30	4,30	+	6,00
25(76.1)	76.1M	57(B1)	7,98	7,19	*	24,74
12(76.4)	76.3M	12.1M	8,53	6,60	*	110,63
15(44.4)	76.3M	2(B1)	10,80	8,61	*	122,38
32(24.3)	76.3M	2(B1)	10,50	8,60	*	122,38

Continua...

Continuação...

Semente	Matriz	Doador de Pólen	Trio LOD score	Trio Delta	Nível de Confiança	Distância de dispersão (m)
7(76.3)	76.3M	99(B4)	7,02	5,92	+	96,00
10(78.2)	76.4M	90(B2)	9,36	6,78	*	84,85
20(76.4)	76.4M	88(B4)	7,86	5,91	+	6,00
25(43.1)	76.4M	28(B4)	9,47	6,12	*	45,69
4(78.2)	76.4M	15(B2)	7,07	4,97	+	120,15
9(1.2)	76.4M	90(B2)	7,83	4,22	+	84,85
11(3.3)	78.2M	106(B3)	18,90	14,80	*	72,25
14(112.4)	78.2M	38(B2)	10,20	5,62	+	13,42
17(43.1)	78.2M	90(B4)	9,21	9,21	*	129,24
2(44.4)	78.2M	6(B1)	6,38	4,30	+	64,62
25(78.2)	78.2M	88(B2)	8,81	5,76	+	13,42
30(24.3)	78.2M	25(B3)	8,30	4,45	+	60,30
4(24.3)	78.2M	84(B2)	6,36	6,36	*	40,25
43(24.3)	78.2M	89(B3)	11,40	5,59	+	68,41
7(28.2)	78.2M	17(B2)	11,00	7,24	*	43,27
7(3.3)	78.2M	47(B3)	6,87	4,80	+	60,00
8(3.3)	78.2M	25(B3)	9,88	6,86	*	60,30
17(3.3)	81.2M	65(B2)	8,31	5,80	+	36,50
20(73.3)	81.2M	28(B4)	10,60	7,01	*	126,14
21(76.4)	81.2M	33(B4)	7,59	5,01	+	90,20
21(78.2)	81.2M	57(B4)	9,47	7,59	*	84,00
25(81.2)	81.2M	91(B2)	5,96	4,89	+	43,27

* Paternidade determinada em P<0,01, delta = 4.53 (nível de confiança de 99%)
+ Paternidade determinada em P<0,05, delta = 3.94 (nível de confiança de 95%)

A Tabela 8 representa um resumo das atribuições de paternidade para diferentes níveis de confiança em cada família analisada. As análises de paternidade revelaram um baixo número de sementes que tiveram o seu doador de pólen determinado, 32% (171) assumindo um nível de confiança de 95%. Esse baixo índice de atribuição pode ser explicado por vários fatores: o primeiro deles é a presença de indivíduos de *E. dysenterica* na coleção de germoplasma oriundos da região nordeste do Estado de Goiás que, apesar de juvenis, podem ter contribuído com o *pool* de pólen dentro da coleção.

O segundo fator é a presença de indivíduos de *E. dysenterica* em outras estações experimentais localizadas nos arredores da Universidade Federal de Goiás que também podem ter contribuído com o *pool* de pólen. Levando-se em consideração que o principal grupo de polinizadores de *E. dysenterica* são as abelhas da família Apidae (Lughadha & Proença, 1996) e que as mesmas possuem um raio de forrageamento, em busca de néctar e pólen, que pode variar entre 750 metros a 24 quilômetros, é possível sustentar a hipótese de fluxo de pólen a grandes distâncias.

O terceiro fator diz respeito à bateria de locos microssatélites utilizada, que não apresentou os valores considerados ótimos para a probabilidade de exclusão de paternidade combinada. Nesse aspecto, vários trabalhos, entre eles o de Collevatti et al. (2001) afirmam

que a probabilidade de exclusão ideal deve ser maior ou igual a 0,99999. Nos locos avaliados a probabilidade foi de 0,99579 (Tabela 3), considerado um valor de médio poder de exclusão.

Tabela 8. Resultados dos testes de atribuição de paternidade para 542 sementes descendentes dos indivíduos da coleção de germoplasma de *E. dysenterica,* para diferentes níveis de confiança.

Matriz	n	99%	95%	90%	85%
20.1M	20	2	5	5	9
76.1M	25	2	6	6	12
40.1M	25	1	5	5	12
17.1M	26	0	7	7	12
43.1M	25	7	13	13	17
12.1M	20	2	8	9	10
1.2M	26	1	3	3	13
28.2M	25	0	2	2	13
24.2M	15	4	5	6	10
34.2M	25	4	9	10	13
78.2M	25	5	13	14	16
81.2M	25	2	5	5	11
3.3M	20	8	13	13	14
40.3M	25	1	3	3	14
76.3M	25	3	4	5	12
24.3M	44	6	10	10	16
73.3M	31	5	10	10	14
108.4M	26	10	12	13	18
27.4M	17	1	2	2	11
31.4M	15	1	2	3	13
112.4M	18	13	14	14	14
76.4M	21	2	7	8	15
44.4M	18	12	13	13	14
Total	**542(100%)**	**92(17%)**	**171(32%)**	**179(33%)**	**303(56%)**

Scariot & Sevilha (2007) e Nass (2001) afirmam que uma característica fundamental das coleções *in vivo* de germoplasma é o fato das mesmas permanecerem isoladas de outras populações, evitando contaminação através de fluxo gênico. Portanto, considerando os fatores que influenciaram no sucesso das atribuições de paternidades, faz-se necessário desenvolver uma nova bateria de locos microssatélites e amostrar os indivíduos da região nordeste do Estado de Goiás, pois só assim, será possível afirmar se a coleção de germoplasma de *E. dysenterica* constitui uma coleção de polinização aberta e isolada de outras populações.

Com base nas 171 sementes que tiveram seu doador de pólen determinado com 95% de confiança na coleção de germoplasma de *E. dysenterica,* a distância de dispersão de pólen variou entre 0 (autofecundações) e 240 m, com média de 64,26 m (± 7,77 m) (Figura 9). A partir da distância de dispersão contemporânea de pólen, a área efetiva média

de vizinhança de polinização (A_{ep}), considerando-se autofecundações, foi estimada em 16.892 m^2 e sem autofecundações essa área foi de 16.056 m^2.

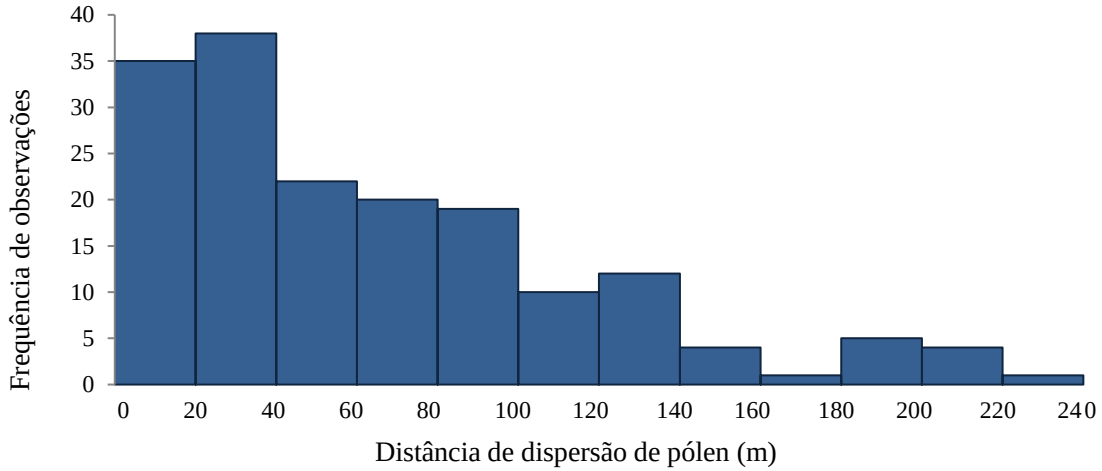

Figura 9. Distribuição de frequência das distâncias de dispersão de pólen na coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, para doadores de pólen atribuídos com 95% de confiança.

Considerando apenas os doadores de pólen atribuídos com 99% de confiança, as frequências de distâncias de dispersão parecem não sofrer modificações significativas, com média de 62,88 m (± 10,03 m) (Figura 10). Neste caso, a área efetiva média de vizinhança de polinização (A_{ep}), considerando-se autofecundações, foi estimada em 17.764 m^2 (aproximadamente 2 ha) e sem autofecundações essa área foi de 16.627 m^2. No entanto, em ambas estimativas, a maioria dos genitores está distante uns dos outros entre 20 m a 40 m e que, à medida que a distância entre os indivíduos aumenta a quantidade de cruzamentos diminui.

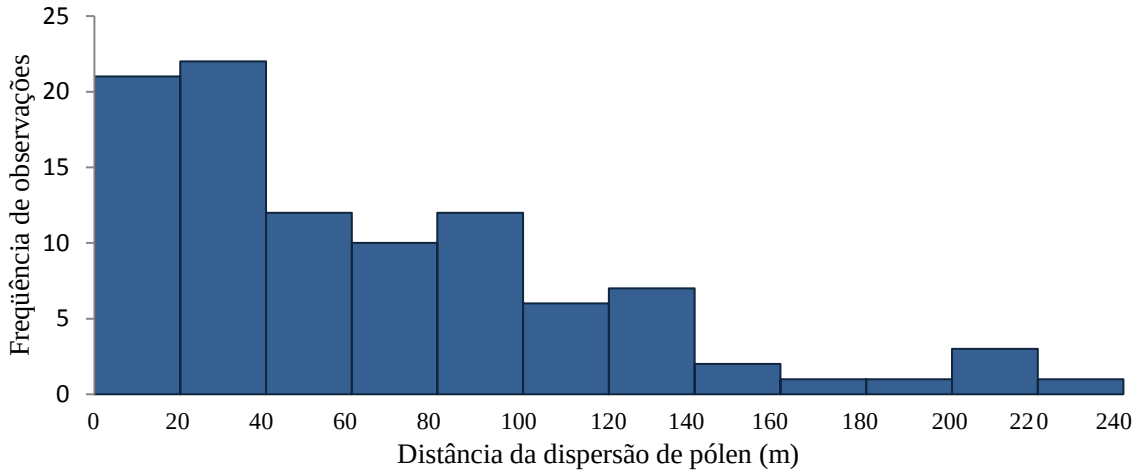

Figura 10. Distribuição de frequência das distâncias de dispersão de pólen na coleção de germoplasma de *E. dysenterica*, para doadores de pólen atribuídos com 99% de confiança.

Embora o alcance da dispersão de pólen tenha sido superior a 200 metros, a maioria dos eventos de polinização ocorreu em distâncias inferiores a 40 metros (Figura 9 e 10). Esse resultado é reflexo da distribuição agregada dos indivíduos na coleção de germoplasma e da interação árvore-polinizador. De acordo com a teoria de forrageamento ótimo (Macarthur & Pianka, 1966), quando a população é grande, a distância de vôo do polinizador entre indivíduos será dependente da densidade, isto é, quanto maior a distância entre os indivíduos maior será a distância média de vôo do polinizador. Em *Tabebuia aurea*, uma espécie tropical e polinizada por abelhas, por exemplo, verificou-se baixa proporção de eventos de polinização em longas distâncias (Moreno, 2009; Medeiros, 2010). Ao contrário das espécies *Dicorynia guianensis* e *Platypodium elegans* que apresentaram alta proporção de eventos de polinização em longas distâncias (Hamrick & Murawski, 1990; Latouche-Hallé et al., 2004). A diferença entre esses dois grupos de espécies está na densidade, enquanto a *Tabebuia aurea* apresenta distribuição agregada, as espécies *Dicorynia guianensis* e *Platypodium elegans* apresentam baixa densidade.

É importante ressaltar que outros fatores, além da distribuição espacial, afetam a dispersão de pólen dentro e entre indivíduos (Levin, 1981). De acordo com Jones et al. (2008) o comportamento dos polinizadores podem ser influenciados por várias caracteristícas da espécie. Essas características morfológicas e fenológicas incluim: a fenologia de florescimento, a estrutura da flor e a abundância de pólen e néctar.

Janzen (1971) afirmou que os polinizadores, em especial as abelhas, tendem a permanecer dentro de um dossel ou podem se mover nas copas das árvores vizinhas, quando há alta densidade de indivíduos florescendo. No entanto, os voôs podem ser longos, quando os recursos florais são escassos. Dessa forma, aos eventos autofecundação e fedundação cruzada em curtas distâncias na coleção de germoplasma de *E. dysenterica* pode ser explicado, principalmente, pelos efeitos da floração "*big-bang*" e pela proximidade entre os indivíduos adultos vizinhos.

É importante ressaltar ainda que o alcance máximo de dispersão de pólen de 224 m abrangeu quase toda a área experimental da coleção de germoplasma (254 m por 54 m). Neste caso, pode-se afirmar que o fluxo gênico entre os indivíduos da coleção está sendo bem abrangente espacialmente e eficiente (Figura 11).

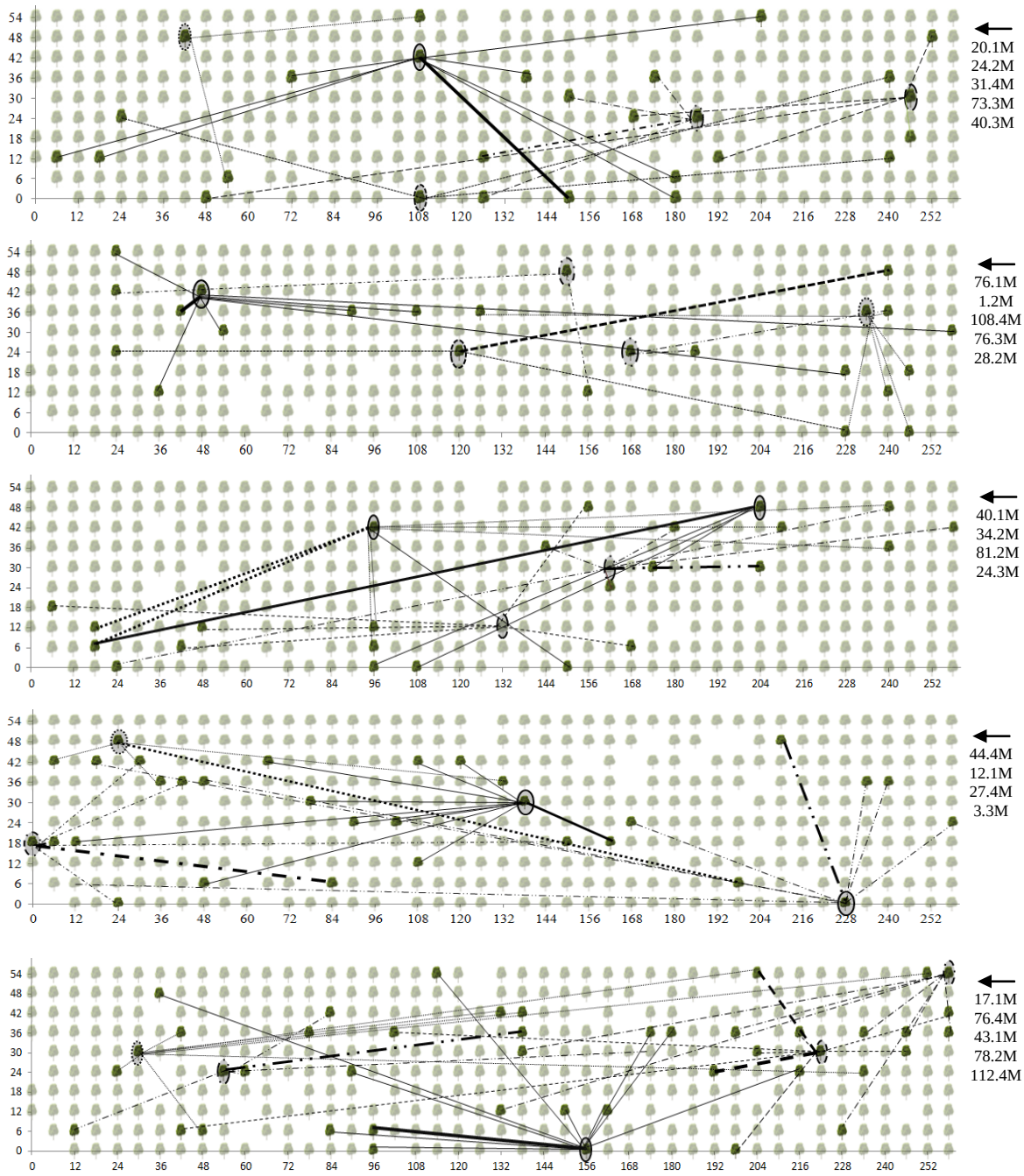

Figura 11. Dispersão de pólen dentro da coleção de germoplasma. Os círculos abertos representam as 23 matrizes; a espessura do traço indica a frequência dos eventos de polinização do doador de pólen; e a as setas as matrizes representadas.

4.4 IMPLICAÇÕES PARA AO MELHORAMENTO GENÉTICO DA ESPÉCIE

A coleção *in vivo* de germoplasma de *Eugenia dysenterica* mantida pela Universidade Federal de Goiás foi implantada em 1996, e desde então, já foi avaliada quanto ao tamanho efetivo e caracteres morfológicos de desenvolvimento, além da caracterização genética das populações de origem por marcadores moleculares e enzimáticos (Silva et at., 2001; Telles et al., 2003; Zucchi et al., 2003; Aguiar et al., 2009). Nesse sentido, o presente trabalho complementou as informações já obtidas para esta coleção, e ainda, poderá fornecer suporte aos futuros programas de melhoramento e manejo da espécie, tendo como bases os estudos baseados em marcadores moleculares.

O conhecimento da diversidade genética existente na coleção de germoplasma de cagaiteira permitirá ao melhorista manipular o germoplasma disponível, buscando genótipos que, através de metodologias adequadas, possam gerar materiais genéticos superiores. Além disso, por meio da análise da diversidade genética pode-se determinar locais para futuras coletas de germoplasma da espécie.

O conhecimento do sistema reprodutivo da espécie, bem como o fluxo gênico contemporâneo de uma população é sempre um fator relevante no melhoramento e manejo da espécie. A importância da paternidade refere-se não somente ao aspecto do conhecimento da dispersão de pólen, mas também a sua utilização em futuras etapas de melhoramento, bem como a correta multiplicação das sementes e de indivíduos. Outro aspecto relevante no que diz respeito à paternidade e ao fluxo gênico está relacionado ao controle da pureza genética em campos de produção de sementes. Assim, é possível utilizar a coleção de germoplasma de cagaiteira como pomar de sementes; selecionando-se as melhores matrizes entre e dentro de progênies, com polinização aberta, o que corresponde a uma seleção apenas de gametas femininos.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

i) A coleção *in vivo* de germoplasma de *Eugenia dysenterica* DC. mantida pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás apresenta grande variabilidade genética, detectada pelos marcadores microssatélites;

ii) A fecundação cruzada entre parentes e a autofecundação estão ocorrendo na coleção de germoplasma com baixa frequência;

iii) Corroborando a literatura os indivíduos de *E. dysenterica* da coleção de germoplasma apresentam sistema reprodutivo misto, combinando autofecundação e fecundação cruzada, com predomínio de cruzamentos;

iv) As distâncias curtas de polinização são mais frequentes em função do padrão de distribuição dos indivíduos de *E. dysenterica* da coleção de germoplasma;

v) Compreendendo quase toda a área experimental da coleção de germoplasma, o fluxo gênico via pólen foi considerado abrangente e eficiente.

6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. V.; VENCOVSKY, R.; CHAVES, L. J.; MOURA, M. F.; MORAIS, L. K. Genetics and expected selection gain for growth traits in *Eugenia dysenterica* DC. populations. **Bragantia**, v. 68, n. 3, p. 629-637, 2009.

ALFENAS, C. A. I. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: SIF, 1998, 242 p.

ALMEIDA, S. P.; SANO, S. M. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. **Cerrado: ambiente e flora**, 1998.

AMAR, M. J. A.; AMAR, A. M. **Investigação de paternidade e maternidade:** aplicações médico-legais do DNA. São Paulo: Icone Editora, 1991, 102 p.

BARREIRA, S.; SEBBENN, A. M.; SCOLFORO, J. R. S.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sob exploração. **Scientia Forestalis**, v. 71, p. 119-130, 2006.

BARRETT, S. C. H.; HARDER, L. D. Ecology and evolution of plant mating. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 2, p. 73-79, 1996.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v. 99, n. 6, p. 580-591, 2007.

BOISTEIN, D. R. L.; SKOLNICH, M. H.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Hum. Genet**, v. 32, n. 314, 1990.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005, 525 p.

BOREM, M.; CAIXETA, E. T. **Marcacores Moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009, 532 p.

BOSHIER, D. H.; CHASE, M. R.; BAWA, K. S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood, and population substructure. **American journal of botany**, p. 484-490, 1995.

BRAGA, A. C.; REIS, A. M. M.; LEOI, L. T.; PEREIRA, R. W.; COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species Tabebuia aurea (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 1, p. 53-56, 2007.

BRITO, M. A.; PEREIRA, E. B.; PEREIRA, A. V.; RIBEIRO, J. F. **Cagaita, Biologia e manejo**. Planaltina-DF: Embrapa-Cerrados, 2003.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007, 111 p.

BROWN, A. H. D. Genetic characterization of plant mating systems. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant populations genetics, breeding and genetic resourses**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. 145-162 p.

BURGESS, B.; MOUNTFORD, H.; HOPKINS, C. J.; LOVE, C.; LING, A. E.; SPANGENBERG, G. C.; EDWARDS, D.; BATLEY, J. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers derived in silico from Brassica oleracea genome shotgun sequences. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 1191-1194, 2006.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BOREM, M.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 11-93 p.

CASIVA, P. V.; VILARDI, J. C.; CIALDELLA, A. M.; SAIDMAN, B. O. Mating system and population structure of *Acacia aroma* and *A. macracantha* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, n. 1, p. 58-64, 2004.

CHAVES, L. J. Domesticação e Uso de Espécies Frutíferas do Cerrado. **54 Reunião Anual da SBPC**. Goiânia, 2002.

CHAVES, L. J.; TELLES, M. P. C. Cagaita. In: VIERA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Ed.). **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 120-133 p.

CHIN, E. C. L.; SENIOR, M. L.; SHU, H.; SMITH, J. C. S. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variationn. **Genome**, v. 39, p. 866-873, 1996.

CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, p. 814-818, 1980.

CLEMENT, C. R. Melhoramento de espécies nativas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001.

COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, p. 72-84, 1969.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, n. 6, p. 748-756, 1999.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 349-356, 2001.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos e agrônomicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 419-423, 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas utéis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

COSTA, S. S. **Caracterização genética de populações naturais de cajujinho do Cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz)** 2004. 70 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.

COTTRELL, J.; VAUGHAN, S.; CONNOLLY, T.; SING, L.; MOODLEY, D.; RUSSELL, K. Contemporary pollen flow, characterization of the maternal ecological neighbourhood and mating patterns in wild cherry (Prunus avium L.). **Heredity**, v. 103, n. 2, p. 118-128, 2009.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1979, 590 p.

CURY, R. **Dinâmica evolutiva e caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) na agricultura autóctone do Sul do Estado de São Paulo**. 1993. 103 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade São Paulo, Piracicaba, 1993.

DIAS, P. M. B. **Caracterização e análise da diversidade denética da coleção nuclear de germoplasma de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) através de marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares.** . 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Zootecnia: Plantas Forrageiras) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M. F.; FRANCO, G. A. D. C.; RATTERS, J. A. Seleção de fragmentos prooritários para a criação de unidades de conservação do Cerrado no Estado de São Paulo. **Revista do Inst. Floresta**, v. 18, p. 23-37, 2006.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-455, 2004.

ELLSTRAND, N. C. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. **Oikos**, p. 77-86, 1992.

ENDRESS, P. K. Origins of flower morphology. **Journal of Experimental Zoology**, v. 291, n. 2, p. 105-115, 2001.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa, 2007, 102 p.

FERES, J.; MARTINEZ, M. L. L.; MARTINEZ, C. A.; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. N. A. L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species Tabebuia roseo-alba. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 434-437, 2009.

FERES, J. M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: implicações para a conservação**. 2009. 142f f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribierão Preto-SP, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética**. 3 ed. Brasília-DF: Embrapa, 1998.

FERREIRA, R. R.; LABORDA, P. R.; SANTOS, M. O.; MAYOR, M. S.; MESTRINER, M. A.; SOUZA, A. P.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 5, p. 1281-1285, 2008.

FRANCESCHINELLI, E. V.; BAWA, K. S. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). **Heredity**, v. 84, n. 1, p. 116-123, 2000.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: SBG - Sociedade Brasileira de Genética, 2008, 280 p.

FRYXELL, P. A. Mode of reproduction of higher plants. **The Botanical Review**, v. 23, n. 3, p. 135-233, 1957.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: SBG, 1992, 631 p.

GOEDERT, C. O. Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 25-60 p.

GOLDFARB, P. Applications of recombinant DNA technology to diagnostics. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 389-394, 1986.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHOLOTTER, C. **Microsatellites:** Evolution and Aplications. New York: Oxford University Press, 1999, 343 p.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C. G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, p. 47-79, 2005.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 6, p. 485, 1995.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em *Myrtaceae* do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R.; GELBART, W. M.; SUZUKI, D. T.; MILLER, J. H. **Introdução a Genética**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 743 p.

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

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 351, n. 1345, p. 1291-1298, 1996.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A. The breeding structure of tropical tree populations. **Plant Species Biology**, v. 5, n. 1, p. 157-165, 1990.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A.; NASON, J. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Plant Ecology**, v. 107, n. 1, p. 281-297, 1993.

HARDY, O. J.; MAGGIA, L.; BANDOU, E.; BREYNE, P.; CARON, H.; CHEVALLIER, M. H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 2, p. 559-571, 2006.

HOLSINGER, K. E. Reproductive systems and evolution in vascular plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 13, p. 7037, 2000.

JANZEN, D. H. *Euglossine* bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, v. 171, n. 3967, p. 203, 1971.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, v. 314, n. 6006, p. 67-73, 1985.

JONES, A. G.; ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 10, p. 2511-2523, 2003.

JONES, M. E.; SHEPHERD, M.; HENRY, R.; DELVES, A. Pollen flow in *Eucalyptus grandis* determined by paternity analysis using microsatellite markers. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 1, p. 37-47, 2008.

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

KARASAWA, M. M. G. **Diversidade Reprodutica de Plantas:** Uma perspectiva evolutiva e bases genéticas. Riberão Preto, SP: SBG, 2009, 113 p.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN, T. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the techonologies**. Roma: IPGRI, 1997, 47 p.

KIMURA, M.; WEISS, G. H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v. 49, n. 4, p. 561, 1964.

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

LATOUCHE-HALLÉ, C.; RAMBOER, A.; BANDOU, E.; CARON, H.; KREMER, A. Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 5, p. 1055-1064, 2004.

LEÃO, P. C. S. **Recursos genéticos de videira (Vitis spp.): análise da diversidade e manejo da coleção de germoplasma da Embrapa Semi-Árido**. 2008. 126 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) -, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

LEE, S. L. Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. f.(Dipterocarpaceae) in three different forest types and a seed orchard. **Heredity**, v. 85, n. 4, p. 338-345, 2000.

LEOI, C. T. L. **Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites em *Arachis hypigaea***. 2003. 156 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2003.

LEVIN, D. A. Dispersal versus gene flow in plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 233-253, 1981.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular and Biology Evolution**, Chicago, v. 4, p. 203-221, 1987.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 397, 1989.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 368 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual review of ecology and systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.

LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (*Myrtaceae*). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 480-503, 1996.

MACARTHUR, R. H.; PIANKA, E. R. On optimal use of a patchy environment. **American naturalist**, v. 100, p. 603-609, 1966.

MACHADO, R. B.; RAMOS-NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília: Conservação Internacional, 2004, 26 p.

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

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, n. 6, p. 957-969, 2006.

MEDEIROS, A. C. B. **Fluxo de pólen e estrutura genética espacial em uma população de Tabebuia aurea (Bignoniaceae) na estação ecológica de Águas Emendadas, DF**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) -, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; THOMSEN, J. B.; DA FONSECA, G. A. B.; OLIVIERI, S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. **Conservation Biology**, v. 12, n. 3, p. 516-520, 1998.

MOREIRA, P. A.; FERNANDES, G. W.; COLLEVATTI, R. G. Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. **Forest Ecology and Management**, v. 258, n. 12, p. 2690-2695, 2009.

MORENO, M. A. **Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo**. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Recusos Florestais: Conservação de Ecossistemas Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2009.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. **Methods Enzymol.**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURAWSKI, D. A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K. S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea species* from Sri Lankan tropical rain forests. **Biotropica**, p. 23-29, 1994.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v. 67, n. 2, p. 167-174, 1991.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, v. 88, n. 4, p. 264-276, 1997.

NASS, L. L. Utilizacão de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 29-56 p.

NAVES, R. V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos**. 1999. 224 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small 174 number of individual. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1977.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, n. 3, p. 347-354, 1995.

PAIVA, J. R.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Outcrossing rates inbreeding coefficients in rubber trees (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Mueller. Arg.). v. 16, n. 4, p. 1003-1011, 1993.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J. V.; CIAMPI, A. Y.; COELHO, A. S. G. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 6, p. 1329-1331, 2008.

PROENÇA, C. E. B.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric *Myrtaceae* from central Brazil. **New Phytologist**, v. 126, p. 343-354, 1994.

QUEROL, D. **Recursos Genéticos, nosso tesouro esquecido**. Rio de Janeiro: ASPTA, 1993.

RABELO, S. G.; TEIXEIRA, C. F.; TELLES, M. P. C.; COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora ericoides*, an endangered Cerrado shrub species. **Conservation Genetics Resources**, p. 1-3, 2011.

RAJORA, O. P.; RAHMAN, M. H.; BUCHERT, G. P.; DANCIK, B. P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 339-348, 2000.

RAO, N. K. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechonology. **African Journal of Biotechonology**, v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. A. B.; SILVA, M. R. Distribuição das espécies lenhosas da fitofisionomia Cerrado sentido restrito nos estados compreendidos pelo bioma Cerrado **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v. 5, p. 5-43, 2000.

RIBEIRO, A. R.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Rev. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 418, 2004.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, v. 81, n. 3, p. 235-237, 1990.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, v. 88, n. 4, p. 221-228, 2002.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, v. 47, n. 1, p. 35-52, 1981.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P. E. POLDISP: a software package for indirect estimation of contemporary pollen dispersal. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 763-766, 2007.

ROUTLEY, M. B.; MAVRAGANIS, K.; ECKERT, C. G. Effect of population size on the mating system in a self-compatible, autogamous plant, *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). **Heredity**, v. 82, n. 5, p. 518-528, 1999.

SANO, S. M.; FONSECA, C. E. L.; RIBEIRO, J. F.; OGA, F. M.; LUIZ, A. J. B. Folhação, floração, frutificação e crescimento inicial da cagaiteira em Planaltina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 5-14, 1995.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Criopreservação de germoplasma vegatal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recusos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 231-280 p.

SCARIOT, A. O.; SEVILHA, A. C. Conservação *in situ* de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

SCHOLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, Berlin, v. 109, p. 365-371, 2000.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; ZANATTO, A. C. S. Estimativas de ganhos genéticos na seleção em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze, incorporando informações do sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, v. 14, n. 1, p. 65-77, 2002.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Florestalis**, v. 58, p. 127-143, 2000.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. Sci. **Forest., Piracicaba**, v. 69, p. 13-24, 2005.

SIGRIST, M. S. **Divergência genética em *Curcuma longa* L. utilizando marcadores microssatélites e agromorfológicos**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) -, Instituto Agronômico, Campinas, SP, 2009.

SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; R.V, N. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do Estado de Goiás, Brasil. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 23, n. 2, p. 330-334, 2001.

SILVA-JUNIOR, J. F. A cultura da mangaba. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 0-0, 2004.

SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790-1793, 2008.

SILVERTOWN, J. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 157-168, 2008.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787, 1987.

SMOUSE, P. E.; DYER, R. J.; WESTFALL, R. D.; SORK, V. L. Two-Generation analysis of pollen flow across a landscape I. male gamete heterogeneity among females. **Evolution**, v. 55, n. 2, p. 260-271, 2001.

SOARES, T. N.; MELO, D. B.; RESENDE, L. V.; VIANELLO, R. P.; CHAVES, L. J.; COLLEVATTI, R. G.; TELLES, M. P. C. Development of microsatellite markers for the neotropical tree species *Dipteryx alata* (Fabaceae). **American journal of botany**, v. 99, n. 2, p. e72-e73, 2012.

SOBIERAJSKI, G. R.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em nove populações de *Mimosa scabrella* Bentham (Leguminosaceae) Mating system in nine *Mimosa scabrella* Bentham population (Leguminosaceae). **Scientia Florestalis**, n. 71, p. 37-49, 2006.

SORK, V. L.; NASON, J.; CAMPBELL, D. R.; FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 6, p. 219-224, 1999.

SOUZA, A. M. **Estrutura genética de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. na Bacia do Alto Rio Grande**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) -, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2006.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae) **Revista Bras. Bot.**, v. 26, n. 1, p. 113-121, 2003.

STATSOFT, S. 7.0 Software. **StaSoft, Tucksa, USA**, 2005.

TAUTZ, D. S. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nuc. Acid. Res.**, New York, v. 16, n. 17, p. 6463-6471, 1989.

TELLES, M. P. C.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; VALVA, F. D. A. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC.("cagaiteira"–*Myrtaceae*) in Central Brazil: Spatial analysis and implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, v. 4, n. 6, p. 685-695, 2003.

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

TELLES, M. P. C.; SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; DINIZ FILHO, J. A. F. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, 2001.

TELLES, M. P. C.; SILVA, S. P.; RAMOS, J. R.; N, S. T.; MELO, D. B.; RESENDE, L. V.; BATISTA, E. C.; VASCONCELLOS, B. F. Estrutura genética em populações naturais

de *Tibouchina papyrus* (pau-papel) em áreas de campo rupestre no cerrado. **Revista Brasil. Bot.**, v. 33, n. 2, p. 291-300, 2010.

TRINDADE, M. G.; CHAVES, L. J. Genetic Structure of natural *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, acessed by morphological traits and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, 2005.

TRINDADE, M. G. **Estrutura genética de populações naturais de cagaiteria (*Eugenia dysenterica* DC) do nordeste de Goiás, Brasil**. 2001. 133 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.

TUSKAN, G. A.; GUNTER, L. E.; YANG, Z. K.; YIN, T. M.; SEWELL, M. M.; DIFAZIO, S. P. Characterization of microsatellites revealed by genomic sequencing of *Populus trichocarpa*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 34, n. 1, p. 85-93, 2004.

UFLA. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Boletim Técnico**, Lavras, n. 78, p. 1-21, 2008.

VALLOIS, A. C.; NASS, L. L.; GOES, M. Conservação *ex situ* de recursos genéicos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 123-147 p.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

VASCONCELOS, E. S.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; FERREIRA, A. Estratégias de amostragem e estabelecimento de coleções nucleares. **Pesq. agropec. bras. Brasília**, v. 42, n. 4, p. 507-514, 2007.

VENCOVSKY, R.; NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A. J. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 231-280 p.

VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAO, V. R. Genetic characterization and its use in decision-making for the conservation of crop germplasm. **The Role of Biotechnology**, Turin, v. 5, n. 7, p. 121-128, 2005.

VOGLER, D. W.; KALISZ, S. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. **Evolution**, v. 55, n. 1, p. 202-204, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. Amplified Fragment Length Polymorphism. **Nucleic Acid Res.**, New York, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005, 778 p.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. Sinauer Associates, 1996.

WENDT, S. N.; SOUSA, V. A.; QUOIRIN, M.; MAZZA, M. C.; STURION, J. A.; SEBBENN, A. M. Baixa taxa de contaminação de pólen, desvios de cruzamentos aleatórios e endogamia em um pomar de sementes de *Ilex paraguariensis* l. **Scientia Florestalis**, v. 37, n. 82, p. 185-196, 2009.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WORKMAN, P. L.; NISWANDER, J. D. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. **American Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 1, p. 24, 1970.

WRIGHT, S. Systems of mating. II. The effects of inbreeding on the genetic composition of a population. **Genetics**, v. 6, n. 2, p. 124, 1921.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97, 1931.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, n. 2, p. 114, 1943.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Human Genetics**, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949.

YORINORI, J. T.; KIIHL, R. A. D. S. Melhoramento de plantas visando resistência a doenças. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 715-736 p.

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

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (*Myrtaceae* family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, 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**, v. 26, p. 449, 2003.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; COUTO, M. A.; MORAIS, L. K.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 975-980, 2005.