

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Alline Afonso do N. C. de Miranda

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL INTRAPOPULACIONAL EM
Stryphnodendron adstringens (BARBATIMÃO FABACEAE)**

Orientadora:

Dr.^a Mariana Pires de Campos Telles

GOIÂNIA - GO ABRIL – 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

E DISSERTAÇÕES 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 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor

ALLINE AFONSO DO NASCIMENTO CREADO DE MIRANDA

3. Título do trabalho

Estrutura genética espacial intrapopulacional em *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO FABACEAE)

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: **a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;- Publicação como capítulo de livro; - Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Pires De Campos Telles, Professora do Magistério Superior**, em 15/06/2020, às 21:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALLINE AFONSO DO NASCIMENTO CREADO DE MIRANDA, Discente**, em 16/06/2020, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1372738** e o código CRC **67D37881**.

ALLINE AFONSO DO N. C. DE MIRANDA

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL INTRAPOPULACIONAL EM
Stryphnodendron adstringens (BARBATIMÃO FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora:

Dr.^a Mariana Pires de Campos Telles

Goiânia, GO – Brasil 2020

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

Miranda, Alline Afonso do Nascimento Creado de
Estrutura genética espacial intrapopulacional em
Stryphnodendron adstringens (BARBATIMÃO FABACEAE) [manuscrito] /
Alline Afonso do Nascimento Creado de Miranda. 2020.
52 f.

Orientador: Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular, Goiânia, 2020.
Bibliografia. Apêndice.
Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Barbatimão. 2. Clones. 3. Diversidade genética. 4. SSR. I. Telles,
Mariana Pires de Campos, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **086** da sessão de Defesa de Dissertação de ALLINE AFONSO DO NASCIMENTO CREADO DE MIRANDA, que confere o título de Mestre(a) em **Genética e Biologia Molecular**.

Ao/s **treze dias do mês de abril de 2020**, a partir da(s) **08h30**, por videoconferência, seguindo portaria CAPES no. 36 de 16 de março de 2020 e recomendação da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Estrutura genética espacial intrapopulacional em *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO FABACEAE)”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) Mariana Pires de Campos Telles (ICB-UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) Ramilla dos Santos Braga, membro titular externo, **cuja participação ocorreu através de videoconferência**; Professor(a) Doutor(a) Rafael Barbosa Pinto, membro titular externo, **cuja participação ocorreu através de videoconferência**. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado(a)** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) Mariana Pires de Campos Telles, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **treze dias do mês de abril de 2020**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Barbosa Pinto, Usuário Externo**, em 13/04/2020, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Pires De Campos Telles, Professor do Magistério Superior**, em 13/04/2020, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **RAMILLA DOS SANTOS BRAGA, Usuário Externo**, em 13/04/2020, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1274319** e o código CRC **BBD4C4BC**.

Referência: Processo nº 23070.015015/2020-04

SEI nº 1274319

DEDICATÓRIA

DEDICO

AOS MEUS AMADOS FILHOS.

OFEREÇO

AO MEU QUERIDO E AMADO AMIGO E ESPOSO, RICARDO CREADO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos de fomento que viabilizaram e tornaram possível o desenvolvimento e a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. José Alexandre Felizola Diniz Filho pela coordenação dos projetos financiados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo: nº 402178/2016-5) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG; Chamada: nº 07/2014, Processo: nº 201410267001736). Esse trabalho foi desenvolvido no contexto do INCT em Ecologia, Evolução e Conservação da Biodiversidade (EECBio), ao qual também agradeço.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela concessão da bolsa de estudo, que foi muito importante para o desenvolvimento do trabalho de mestrado.

Minha gratidão ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFG e aos professores pela dedicação, paciência e qualidade do ensino.

À minha orientadora, Professora Dr.^a Mariana Telles, por me conceder essa oportunidade. Agradeço a paciência, por sua disponibilidade e acessibilidade e por me impulsionar a fazer sempre melhor.

Gratidão à toda equipe do Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da UFG, principalmente à Ariany Rosa, que desde o início me deu o suporte necessário em todas as etapas desse estudo sempre de forma muito prestativa e paciente.

Ao meu querido e amado esposo Ricardo Creado, que nunca me deixa desistir ou desanimar, está sempre ao meu lado com parceria, amor, dedicação e admiração. Sou muito grata por suas palavras e ações sempre de muito bom senso e carinho.

Aos meus filhos, Marina e Heitor, é por eles que tento fazer sempre o melhor. Graças a eles eu tenho sempre motivos para não desistir pois, sei que eles têm em mim fonte de inspiração.

Aos meus pais, sogros, cunhados e à minha irmã eu agradeço por estarem sempre prontos a me ajudar, cuidando dos meus filhos, sempre que necessário, com amor e carinho para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Agradeço imensamente a Deus por me guiar e iluminar colocando em meu caminho pessoas e situações que me fazem crescer e melhorar a cada dia, me permitindo seguir e vencer os desafios com resignação e persistência crendo sempre em dias melhores.

SUMÁRIO

Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
Resumo	8
Abstract	9
1 Introdução	10
2 Objetivos	12
2.1 Objetivo geral	12
2.1 Objetivo específico	12
3 Revisão da literatura	13
3.1 A espécie <i>Stryphnodendron adstringens</i>	13
3.2 Cerrado	16
3.3 Marcadores microsatélites	17
3.4 Diversidade genética e estrutura genética espacial	19
4 Material e métodos	22
4.1 Área de estudo e coleta	22
4.2 Obtenção dos dados moleculares	23
4.3 Análises estatísticas	26
4.31 Caracterização da diversidade genética	26
4.32 Tamanho efetivo de endogamia e taxa de fecundação cruzada	28
4.33 Estrutura genética espacial	28
4.33 Análise de identidade genética (clones)	30
5 Resultados e discussão	31
5.1 Caracterização da diversidade genética	31
5.2 Tamanho efetivo de endogamia e taxa de fecundação cruzada	35
5.3 Estrutura genética espacial	36
5.4 Análise de identidade genética (clones)	38
6 Conclusão	42
7 Referências bibliográficas	43
8 Apêndice	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore de *Stryphnodendron adstringens*, pertencente à população natural do Parque Estadual da Serra Dourada – Goiás..... 13
- Figura 2.** Fruto imaturo de *Stryphnodendron adstringens* pertencente a uma população natural do Parque Estadual da Serra Dourada – Goiás. 15
- Figura 3.** Localização do Parque Estadual da Serra Dourada no Estado de Goiás ocupando partes dos municípios de Mossâmedes, Cidade de Goiás e Buriti de Goiás 22
- Figura 4.** Distribuição (longitude x latitude) de indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* de uma população natural situada no Parque Estadual da Serra Dourada – Goiás. 23
- Figura 5.** Gráfico da distribuição das frequências alélicas de nove locos microssatélites utilizados para análise genética em uma população natural de *Stryphnodendron adstringens*. O eixo das ordenadas corresponde às frequências alélicas e as abscissas representam os alelos encontrados em cada loco. 32
- Figura 6.** Parentescograma: relação coeficiente de parentesco (F_{ij}) e distância média entre os indivíduos dentro de seis classes de distância em população natural de *Stryphnodendron adstringens* localizada do Parque Estadual da Serra Dourada – Goiás. 36
- Figura 7.** Distribuição de *Stryphnodendron adstringens* intercalados por grupos de *Stryphnodendron polyphyllum*. Os pontos azuis indicam grupos de *Stryphnodendron adstringens* e a linha pontilhada o espaço que separa esses grupos. O eixo das ordenadas representa as coordenadas de Longitude e o eixo das abscissas a latitude. Distâncias entre os pontos: A/B = 218 m; C/D = 297 m; D/E = 543 m. 38
- Figura 8.** Gráfico da comparação das distâncias espaciais (m) entre os 18 pares de indivíduos dentro de dez conjuntos de indivíduos de genótipos idênticos em uma população natural de *Stryphnodendron adstringens* a partir da análise de nove locos microssatélites. 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers, desenvolvidos e otimizados para <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Barateli, 2018), em cada loco, motivo de repetição das regiões microssatélites e temperatura de anelamento de cada loco.	25
Tabela 2. Protocolo dos reagentes usados para a amplificação das regiões microssatélites em <i>Stryphnodendron adstringens</i>	25
Tabela 3. Multiplex de aplicação (GONÇALVES, 2020; no prelo) para <i>Stryphnodendron adstringens</i> com o nome de cada loco, sua amplitude alélica e a fluorescência de cada primer.	26
Tabela 4. Condições consideradas para escolha de seis classes de distância para análise de parentesco Fij em uma população natural de <i>Stryphnodendron adstringens</i> a partir de nove locos microssatélites. Número de pares: número de pares de comparações dentro de cada intervalo de distância; Partic. (%) : porcentagem de todos os indivíduos representados pelo menos uma vez no intervalo de distância; C.V.: coeficiente de variação do número de vezes que cada indivíduo é representado.	29
Tabela 5. Classes de distância utilizadas para análise de estrutura genética espacial em uma população natural de <i>Stryphnodendron adstringens</i> a partir de nove locos microssatélites. Distância máxima (metros) que define o intervalo entre as classes e distância média (metros) entre os pares observados.	29
Tabela 6. Caracterização da diversidade genética em nove locos microssatélites de uma população natural de <i>Stryphnodendron adstringens</i> . N: número de indivíduos; A: número de alelos por loco; Ae: número efetivo de alelos; He: heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; Ho: heterozigosidade observada; Hmáx: diversidade genética máxima; He/Hmáx: proporção de diversidade máxima f: índice de fixação intrapopulacional ou coeficiente de endogamia; Q: probabilidade de exclusão de paternidade; PI: probabilidades de identidade.	33
Tabela 7. Comparação entre os valores de He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada e f: coeficiente de endogamia entre espécies arbóreas do Cerrado e <i>Stryphnodendron adstringens</i>	35
Tabela 8. Estimativas usadas para a construção do parentescograma: Classes de distância: seis classes de distância, Distância média (metros): entre os pares observados dentro de cada classe de distância; Valores observados: coeficientes de parentesco observados antes dos testes de	

permutação; **Valor médio:** média do coeficiente de parentesco após os testes de permutação; **I.C. - 95% sup.:** maior valor do do intervalo de confiança de 95% e **I.C. - 95% inf.:** menor valor do do intervalo de confiança de 95%. 37

Tabela 9. Dez conjuntos de clones em uma amostra de 124 indivíduos a partir de nove locos microssatélites numa população natural de *Strypnodendron adstringens* Pares de indivíduos de *Strypnodendron adstringens* com genótipos idênticos para os nove locos analisados, distância espacial (m) entre os pares, **pID:** probabilidade de um indivíduo não relacionado ter esse genótipo e **pIDSib:** probabilidade de um irmão completo ter esse genótipo.. 39

RESUMO

O bioma Cerrado, apesar de conter uma das maiores biodiversidades do planeta, sofre com constantes desmatamentos em função da expansão das fronteiras agrícolas. A perda de território natural leva, consequentemente, a uma perda de diversidade genética. Isso é preocupante quando se trata de espécies nativas, como *Stryphnodendron adstringens*, conhecida popularmente como barbatimão. Diante disso, é importante conhecer as características da biologia de *S. adstringens*, a fim de se estabelecer estratégias eficientes de manejo e conservação. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a diversidade genética, o fluxo gênico (através da estimativa do tamanho do grupo de vizinhança), a presença de clones e a estrutura genética espacial existente dentro de uma população natural de *S. adstringens*. Para tanto, foi extraído o DNA genômico do tecido foliar de 124 indivíduos, todos georreferenciados. Para a amplificação das regiões microssatélites foram utilizados nove pares de *primers* desenvolvidos para a espécie. Com base na matriz de genótipos, foram realizadas as análises de diversidade genética, de tamanho efetivo de endogamia, taxa de fecundação cruzada, estrutura genética espacial e análise de identidade para verificar a existência de clones. Para os nove locos foram encontrados um total de 74 alelos e uma média de 8,2 alelos por loco. A heterozigosidade observada média (H_O) foi igual a 0,556 e a diversidade genética média (H_E) igual a 0,624. O coeficiente de endogamia (f) foi significativo e igual a 0,110, demonstrando excesso de homozigotos. A diversidade genética na população foi considerada alta, com 71% da heterozigosidade máxima esperada. O sistema de cruzamento foi considerado misto com base na taxa de fecundação cruzada ($\hat{t}_a$) igual a 0,80. O tamanho efetivo de endogamia (N_{ef}) foi igual a 111,72; correspondendo a uma representatividade genética de 0,90 indicando que não há deriva genética na população. Houve estrutura genética espacial significativa na primeira classe de distância com os pares até 49 metros. A estatística Sp igual a 0,0095 foi considerada moderada e juntamente com a vizinhança genética ($N_b = 105,3$) demonstrou que a dispersão de pólen é eficiente para manter a diversidade genética na população. Foram encontrados 10 grupos de indivíduos com genótipos idênticos para os nove locos usados, sugerindo a existência de reprodução vegetativa. A partir dos resultados foi possível estabelecer que, para a formação de bancos de germoplasma é indicada coleta com distância de, pelo menos, 49 metros entre os indivíduos assegurando assim contemplar a diversidade genética presente na população.

Palavras-chave: Barbatimão, clones, diversidade genética, SSR

ABSTRACT

The Cerrado biome, despite containing one of the greatest biodiversity on the planet, undergoes constant deforestation due to the expansion of agricultural frontiers. The loss of natural territory consequently leads to the loss of genetic diversity. This is worrying when it comes to native species, such as *Stryphnodendron adstringens*, popularly known as barbatimão. Therefore, it is important to know the characteristics of the biology of *S. adstringens*, in order to define efficient management and conservation strategies. In this context, the objective of this study was to evaluate genetic diversity, genetic flow (estimating the size of the neighborhood group), the presence of clones and the spatial genetic structure existing in a natural population of *S. adstringens*. For this, genomic DNA was extracted from the leaf tissue of 124 individuals, all georeferenced. For the amplification of the microsatellite regions, nine pairs of primers developed for the species were used. Based on the genotype matrix, analyzes of genetic diversity, effective size of inbreeding, cross-fertilization rate, spatial genetic structure and identity analysis were performed to verify the occurrence of clones. For the nine loci, a total of 74 alleles were found and an average of 8.2 alleles per location. The observed average heterozygosity (H_O) was equal to 0.556 and the average genetic diversity (H_E) was equal to 0.624. The inbreeding coefficient (f) was significant and equal to 0.110, showing an excess of homozygotes. The genetic diversity in the population was considered high, with 71% of the maximum expected heterozygosity. The crossing system was considered mixed based on the crossfertilization rate ($\hat{t}_a$) equal to 0.80. The effective size of the consanguinity (N_{ef}) was 111.72; corresponding to a genetic representation of 0.90, indicating that there is no genetic deviation in the population. There was a significant spatial genetic structure in the first distance class with pairs of up to 49 meters. A Sp statistic equal to 0.0095 was considered moderate and associated with the genetic neighborhood ($N_b = 105.3$) demonstrated that pollen dispersion is efficient to maintain genetic diversity in the population. Ten groups of individuals with identical genotypes were found for nine sites used, suggesting the occurrence of vegetative reproduction. The results plan was possible, which, for the formation of germplasm banks, is collected at a minimum distance of 49 meters between the guaranteed items, in addition to contemplating the genetic diversity present in the population.

Keywords: Barbatimão, clones, genetic diversity, SSR

1 INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado possui uma das maiores biodiversidades do planeta, com uma flora que apresenta alto grau de endemismo, além de abrigar as nascentes de três bacias hidrográficas da América do Sul. Apesar da grande relevância desse bioma, o Cerrado vem sofrendo, já há muito tempo, uma redução considerável de sua área em decorrência dos constantes desmatamentos em função da expansão das fronteiras agrícolas, uma vez que parte da sociedade brasileira ainda enxerga o Cerrado apenas como um espaço de importância agropecuária (AGUIAR; CAMARGO, 2004; MELO, 2013).

A redução de território natural pode ocasionar a perda de diversidade genética nas espécies. Isso é preocupante, principalmente, quando se trata de espécies nativas, como é o caso do *Stryphnodendron adstringens* (Mat.) Coville. Uma vez que a diversidade genética dentro de uma população é a garantia que ela tem de sobreviver diante das mudanças ambientais, é a capacidade de adaptação da população (FRANKHAM *et al.*, 2006). Sendo assim, é indispensável estudos a respeito da biologia da espécie, a fim de se estabelecerem estratégias de manejo e conservação eficientes que sejam capazes de assegurar a sua diversidade.

Stryphnodendron adstringens, é uma espécie vegetal nativa do Cerrado e conhecida popularmente como barbatimão. A sua casca possui alta concentração de taninos, o que a torna muito procurada para fins medicinais, inclusive ela se encontra entre os dez recursos fitoterápicos mais explorados pelas populações do Cerrado na região de Alto Paraíso de Goiás (SOUZA; FELFILI, 2006). Além da medicina popular o barbatimão também é explorado pela indústria farmacêutica e em ambos os casos o extrativismo é o principal meio de obtenção dessa matéria-prima e isso acarreta prejuízos às populações naturais dessa planta, pois essa atividade acontece, quase sempre, de forma não sustentável (SANTOS *et al.*, 2002;).

Visando esclarecer aspectos importantes da biologia das espécies, tais como: diversidade genética, fluxo gênico, níveis de endogamia e seus efeitos, a genética da conservação usa de ferramentas moleculares que permitem, por exemplo, a genotipagem de regiões microssatélites, que são utilizadas para medir a diversidade genética em locos individuais (FRANKHAM *et al.*, 2006). Desse modo, foi desenvolvido um conjunto de nove *primers* específicos para a detecção de regiões microssatélites polimórficas no genoma de *S. adstringens* (BARATELI, 2018). O uso dessa ferramenta molecular contribui para a geração de dados importantes acerca da variabilidade genética e da distribuição dessa variabilidade tanto dentro quanto entre as populações (TEMPLETON, 2011).

Outra característica importante acerca da biologia das espécies é a distribuição espacial da variabilidade genética que está diretamente ligada ao fluxo gênico, à deriva genética, à seleção natural ou ainda a eventos históricos como fragmentação populacional, expansão da distribuição geográfica e eventos fundadores ou gargalos. Nas plantas, o fluxo gênico acontece por meio da dispersão de pólen e de sementes (TEMPLETON, 2011). Por esse motivo, geralmente, espécies arbóreas apresentam populações geneticamente estruturadas, ou seja, seus alelos ou genótipos não estão distribuídos de forma aleatória na população. Ainda que a dispersão de pólen seja ampla, se a dispersão de sementes for restrita, por exemplo, isso afetará o fluxo gênico e, consequentemente, a distribuição espacial. Enquanto a dispersão de sementes está intimamente ligada ao comportamento do agente dispersor, se ele percorre ou não grandes áreas, podendo assim se afastar mais ou menos da planta-mãe (LOISELLE *et al*, 1995, SEBBENN; SEOANE, 2005).

A distribuição de sementes, ou dos próprios frutos, a partir da planta-mãe depende de uma série de eventos, sejam eles de origem biótica ou abiótica. Esses eventos irão determinar as distâncias que esses propágulos vão atingir, se afastando mais ou menos da matriz. O conjunto desses eventos é denominado síndrome de dispersão. As principais síndromes de dispersão ocorrem por meio dos seguintes agentes dispersores: Animal (zoocoria), vento (anemocoria), água (hidrocoria) e auto dispersão (autocoria) (HOWE & SMALLWOOD, 1982).

Frente à necessidade de maior conhecimento a respeito das características da biologia de *S. adstringens*, esse trabalho teve como finalidade avaliar a diversidade genética, o fluxo gênico, por meio da estimativa da vizinhança genética, a presença de clones e a estrutura genética espacial presentes dentro de uma população natural. Assim, contribuindo com informações que possam elucidar questões a respeito de seu sistema reprodutivo e de dispersão de pólen e sementes. Esses resultados podem colaborar para a demarcação mais eficiente de pontos de coleta, por exemplo, para formação de bancos de germoplasma para conservação *ex situ*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a diversidade genética e o padrão da estrutura genética espacial intrapopulacional de *Stryphnodendron adstringens* na Reserva Biológica Professor José Ângelo Rizzo, situado no Parque Estadual da Serra Dourada.

2.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar o sistema reprodutivo da espécie a partir da estimativa da taxa aparente de fecundação cruzada;
- ii. Avaliar o fluxo gênico, por meio da dispersão de pólen e sementes, dentro da população a partir da estimativa do tamanho do grupo de vizinhança genética;
- iii. Verificar se há presença de clones dentro da população;
- iv. Calcular o tamanho efetivo por endogamia da população;
- v. Avaliar o padrão de distribuição espacial.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A espécie *Stryphnodendron adstringens*

Stryphnodendron adstringens (Figura 1), conhecida popularmente como barbatimão, barba de timão, casca-da-vidrigade, dentre outros nomes, é uma espécie vegetal pertencente à família Leguminosae (também referida como Fabaceae) (FELFILI *et al.*, 1999) e é considerada endêmica do Brasil (SOUZA; GIBAU, 2020). Está amplamente distribuída no Cerrado *sensu stricto* principalmente nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo. Além disso, a espécie também pode ser encontrada em terrenos baldios (que anteriormente tenham sido ocupados por cerrado) e beiras de estrada. Tem preferência por solos arenosos e de drenagem rápida. É uma espécie de baixa exigência nutricional e não acumuladora de alumínio (FELFILI *et al.*, 1999).



Figura 1. Árvore de *Stryphnodendron adstringens*, pertencente à população natural do Parque Estadual da Serra Dourada – Goiás.

S. adstringens é uma espécie perenifólia, apresentando uma troca gradativa de folhagem ao longo de todo ano, entretanto, durante o período da estação seca, ela possui um pico de queda de folhas, ao mesmo tempo em que emite folhas novas. A troca de folhagem pode ser prejudicada em caso de queimada tardia, que ocorre no final da estação de seca. As folhas de *S. adstringens* são do tipo compostas bipinadas com seis a oito pares de folíolos por pina. Sua floração acontece entre os meses de setembro a novembro, embora também tenha sido registrada nos meses de seca na região do Distrito Federal. Essa espécie apresenta inflorescências andromonóicas (flores masculinas e hermafroditas), suas flores são bastante reduzidas de coloração marrom, e longevidade de, no máximo, dois dias, sendo esse o tempo que a inflorescência leva para atingir a antese (FELFILI *et al.* 1999).

Apenas 20% das flores de *S. adstringens* são produtoras de néctar, em sua maioria as flores hermafroditas, no entanto são bastante visitadas por insetos devido à grande concentração de flores por espigas, já as flores masculinas são as maiores produtoras de pólen. A espécie *S. adstringens* possui polinização do tipo geitonogâmica, nesse tipo de polinização o pólen é transferido da antera de uma flor para o estigma de outra flor, porém na mesma planta. Essa polinização acarreta uma baixa produção de frutos e consequentemente, o número de sementes também é muito reduzido o que torna a espécie virtualmente autoestéril, desse modo a polinização cruzada se torna vital para a produção de frutos e sementes (ORTIZ *et al.*, 2003). Os principais agentes polinizadores de *S. adstringens* são os insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, especialmente as abelhas. Entretanto, *S. adstringens*, e outras espécies do gênero, possuem toxicidade no pólen para a espécie de abelha *Apis mellifera*, levando suas larvas à morte (FELFILI *et al.*, 1999; SCALON, 2007; MEIRA *et al.*, 2013; GOTTSBERGER *et al.*, 2018).

A reprodução vegetativa a partir da emissão de raízes gemíferas é uma característica presente em *S. adstringens* (RIZZINI; HERINGER, 1966). Esse tipo de propagação torna a espécie muito eficiente na ocupação do espaço geográfico porque, a partir de uma única planta há a formação de inúmeros clones ou rametes em diversas direções e distâncias. Os clones se tornam, mais tarde, fisiologicamente independentes do genete (planta – matriz) (MORENO, 2009).

O fruto do barbatimão (Figura 2) é um legume sésil e espesso contendo um número variável de sementes (FELFILI *et al.*, 1999). Apresenta certo grau de maturação durante todo o ano com maior índice na estação da seca, mas isso pode variar de acordo com a localização de sua ocorrência (SCALON, 2007). Em geral, a espécie produz um elevado número de sementes o que poderia lhe conferir uma característica de espécie pioneira, entretanto, grande parte das sementes sofrem com o predatismo de insetos, levando a uma baixa qualidade reprodutiva dessas sementes.

Sua viabilidade também sofre a influência da disponibilidade de recursos, onde a planta é capaz de promover aborto seletivo de sementes de baixa qualidade, para disponibilizar recursos às sementes mais promissoras (ORTIZ *et al.*, 2003). As sementes de *S. adstringens* apresentam dormência, característica muito comum em plantas do Cerrado, a dormência confere a planta uma chance maior de sobrevivência diante das condições ambientais desfavoráveis, como o fogo e longos períodos de seca (MEIRA *et al.*, 2013; GOTTSBERGER *et al.*, 2018). Quanto as síndromes de dispersão em *S. adstringens*, foram relatadas as síndromes por zoocoria, provavelmente realizada por pequenos roedores (FELFILI *et al.*, 1999) e a autocoria que é tida como o principal mecanismo dispersor (PILON *et al.*, 2015).



Figura 2. Fruto imaturo de *Stryphnodendron adstringens* pertencente a uma população natural do Parque Estadual da Serra Dourada – Goiás.

Dentre as espécies do gênero, *Stryphnodendron adstringens* é considerada uma das maiores fontes naturais de tanino (*Stryphno*= *adstringente*, *dendron* = *madeira*). Os taninos são compostos fenólicos, classificados como metabólitos secundários, importantes nos mecanismos de defesa das plantas contra radiação solar, herbivoria e agentes patogênicos. Na casca são encontradas as maiores concentrações dessas substâncias tanantes (MEIRA *et al.*, 2013). Este composto tem atraído o interesse da comunidade científica, na análise de suas propriedades químicas, responsáveis pela atividade antioxidante (anticancerígena), antimicrobiana,

antisséptica, anti-inflamatória, antiparasitária, além de ser neutralizante de peçonha de serpentes botrópicas (LANCHOTI FIORI *et al.*, 2012, FERREIRA *et al.*, 2013). Essas propriedades fazem do barbatimão uma planta amplamente utilizada na medicina popular tanto como planta medicinal ou fitoterápico no tratamento de diversas doenças, sendo incluída na lista de Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Rennisus) (MEIRA *et al.*, 2013). *S. adstringens* também pode ser usada na recuperação de áreas degradadas de cerrado por ser uma planta de característica lenhosa e de cultivo possível (DURIGAN *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2015), com uma taxa de crescimento considerada alta em comparação com o crescimento de gramíneas e baixa taxa de herbivoria (PILON; DURIGAN, 2013).

Stryphnodendron adstringens também tem grande relevância econômica e social para moradores das regiões de ocorrência da espécie, pois essas comunidades tem no extrativismo da sua casca uma fonte de renda complementar, uma vez que o barbatimão faz parte de um grupo de espécies do Cerrado com mercado consolidado. Embora o extrativismo seja uma atividade de importância econômica para essas comunidades, um estudo na região do Distrito Federal, realizados em quatro unidades de conservação, mostrou que dois, em cada cinco indivíduos de *S. adstringens* amostrados, apresentavam sinais de extrativismo predatório. O estudo também constatou que o crescimento das cidades e das fronteiras agrícolas causam grandes perturbações nas populações dessa espécie (FILHO; FELFILI, 2003).

Atendendo à preocupação com extrativismo sustentável do barbatimão, em 2017 foi publicado o “Caderno extrativista do barbatimão”, organizado pelo Ministério do Meio Ambiente, da Agricultura e Agropecuária. Ele aponta a melhor forma de se realizar o extrativismo de forma sustentável. No manual o produtor extrativista pode conhecer melhor a respeito de diversas características da espécie, como por exemplo, a época mais apropriada para efetuar a coleta. Segundo o caderno, o momento ideal para a retirada da entrecasca é quando não houver flores e nem vagens na árvore. Além disso, recomenda-se que a extração da casca seja realizada apenas em árvores que apresentem um DAP (Diâmetro a altura do peito) entre 14,5 cm e 36,5 cm (BRASIL, 2017).

3.2 Cerrado

O bioma Cerrado abrange uma área de 2.036.448 Km² e é o segundo maior bioma brasileiro, ocorrendo nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal. Ele é composto

por um mosaico de formações vegetais, indo de campos abertos a florestas densas, cortando o país em diagonal no sentido nordeste-sudoeste cobrindo 22% do território brasileiro. O Cerrado também pode ser encontrado como encaves em outros biomas, como na Mata Atlântica, na Caatinga e na Floresta Amazônica. Além disso, três grandes bacias hidrográficas da América do sul têm suas nascentes no Cerrado: as bacias Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2019).

O Cerrado apresenta um número elevado de espécies endêmicas, sendo considerado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade, concentrando cerca de 33% de toda diversidade biológica do Brasil. Estima-se que há mais de 11 mil espécies vegetais nativas já catalogadas, além é claro de um grande número de espécies que compõem a fauna do bioma (AGUIAR; CAMARGO, 2004).

Apesar de sua enorme representatividade, o Cerrado tem sido alvo, desde muito tempo, de desmatamentos em decorrência da expansão das fronteiras agrícolas. Por conta de suas condições topográficas favoráveis, o Cerrado tornou-se a principal região brasileira produtora de grãos e de gado de corte. Estimativas apontam uma perda média de 9,75 milhões de hectares por ano no Cerrado. No estado de São Paulo, por exemplo, o Cerrado ocupava uma área de 14% de todo o território e, atualmente, restam apenas 1% desse bioma distribuídos em pequenos fragmentos. Juntamente com o crescimento da exploração agrícola e pecuarista nas áreas de Cerrado, vem crescendo também uma consciência da necessidade de preservação dos recursos naturais através das Áreas de Preservação Permanente ou de Reserva Legal, que são amparadas pela legislação ambiental vigente (AGUIAR; CAMARGO, 2004). De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2019), o Cerrado é o bioma brasileiro que apresenta a menor área de proteção integral. Apenas 8,21% de seu território está legalmente protegido por unidades de conservação.

3.3 Marcadores microssatélites

Marcadores moleculares referentes às regiões microssatélites, conhecidos também como repetições de sequências simples (SSR – Coloca em inglês também) foram descobertos no início dos anos 80 (WATSON *et al.*, 2009). Os microssatélites são regiões do DNA que apresentam repetições em tandem de pequenas sequências nucleotídicas, variando de 1 a 6 nucleotídeos. Como marcadores moleculares são codominantes, ou seja, é possível diferenciar indivíduos homozigotos de heterozigotos e exibem um alto grau de polimorfismo. Além disso, são encontrados tanto em genomas procariotos quanto eucariotos e estão amplamente distribuídos de forma não aleatória

no genoma eucarioto em regiões codificantes e não codificantes (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004; GARRIDO-CARDENAS *et al.*, 2018).

O alto polimorfismo, ou seja, a existência de muitos alelos para o mesmo loco, se dá por conta da sua alta taxa mutacional em relação a outras regiões do genoma. As taxas de mutação variam de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por *locus* por geração (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Entretanto sua dinâmica mutacional ainda não está bem esclarecida, mas alguns mecanismos foram sugeridos para explicar sua alta taxa de mutação. Um desses mecanismos é o chamado *strand-slippage*, onde a enzima DNA polimerase sofre um deslizamento durante a replicação do DNA, levando ao ganho ou perda de unidades de repetição (SCHLOTTERER, 2000). Desse modo, o polimorfismo nas regiões microssatélites está relacionado ao comprimento da região repetitiva, e não ao seu motivo de repetição. Por exemplo, o motivo CA pode variar em números de cópias entre diferentes indivíduos dentro de uma mesma espécie ou mesmo dentro de uma única população (ELLEGREN, 2004). No entanto, a taxa de mutação de um microssatélite pode depender de características particulares, como o número de unidades repetitivas, o comprimento (em pares de bases) e o motivo de repetição. Geralmente os microssatélites com maior número de repetição são mais mutáveis devido ao aumento da probabilidade de deslizamento, enquanto altas taxas locais de substituição causam frequentes repetições de interrupções que tornam o escorregamento menos provável e diminuem as taxas de mutação nos microssatélites (BHARGAVA; FUENTES, 2010).

Graças a essa característica polimórfica dos microssatélites que é possível levantar dados suficientes para determinar as diferenças entre grupos de indivíduos da mesma espécie, favorecendo uma análise das relações genéticas entre indivíduos muito semelhantes, pertencentes à mesma população (PIERCE, 2011). Dessa forma, os microssatélites se tornaram ferramentas muito eficazes para o estudo da genética de populações, testes de paternidade, construção de mapas gênicos, estudos forenses e melhoramento genético de plantas (SCHLÖTTERER, 2004).

A detecção das regiões microssatélites, numa amostra, é feita a partir de reações em cadeia da polimerase (PCR), onde a região é amplificada por meio do uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos, chamados de *primers* (ou iniciadores), que se hibridizam com as sequências únicas que flanqueiam a região microssatélite. Uma das técnicas é a utilização de iniciadores marcados com corantes fluorescentes na sua extremidade 5', assim o fragmento pode ser detectado em um analisador automático de DNA, através da eletroforese capilar, onde um *laser* consegue reconhecer a fluorescência (WATSON *et al.*, 2009).

Apesar da grande variabilidade presente nos microssatélites, as regiões flanqueadoras

são bastante conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie. Sendo assim, espécies relacionadas podem, muitas vezes, compartilhar de um mesmo *primer* para amplificação de um loco (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004). Assim, é possível a transferibilidade de *primers* entre espécies relacionadas, o que diminui os custos para a produção de iniciadores específicos, pois o desenvolvimento desses iniciadores demanda investimento financeiro e mão de obra qualificada (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017). Contudo, uma vez que esses iniciadores são transferidos ou desenvolvidos, os custos são drasticamente reduzidos, assim como as atividades laboratoriais, além de ser uma técnica rápida e acessível (BUSO *et al.*, 2003).

Em plantas, as análises de microssatélites podem ser usadas para conhecer a diversidade genética e a estrutura genética espacial de uma determinada espécie. Bem como inferir a respeito das taxas de fluxo gênico, distância genética e fatores evolutivos diversos que possam estar ocorrendo tanto em nível intrapopulacional como interpopulacional. Por exemplo, espécies endêmicas, como o barbatimão, quando em populações pequenas, se tornam mais susceptíveis à deriva genética e tem um fluxo gênico mais limitado, aumentando a divergência genética interpopulacional e diminuindo a divergência intrapopulacional. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético, manejo, coleta e conservação da espécie (LOVELESS; HAMRICK, 1984; DE MOURA *et al.*, 2009).

3.4 Diversidade genética e estrutura genética espacial

A diversidade genética presente nas espécies é essencial para a sobrevivência delas frente às variações ambientais, uma vez que a perda da variabilidade genética leva a espécie a uma diminuição de seu valor adaptativo. Essa diversidade pode ser manifestada a partir de características como a cor de uma flor num determinado vegetal ou quanto a variação de sequências de DNA entre diferentes organismos, por exemplo. A diversidade genética pode ser avaliada por meio de ferramentas moleculares, como os marcadores microssatélites, e assim é possível descrevê-la com medidas de heterozigosidade média e diversidade alélica (número médio de alelos por loco) em locos individuais (FRANKHAM *et al.*, 2006). A heterozigosidade é uma medida de diversidade genética, analisando as variações nas frequências alélicas dentro ou entre populações. Em populações grandes, exogâmicas, de acasalamento ao acaso e livres de forças evolutivas, as frequências alélicas e genotípicas tendem a atingir o equilíbrio após uma geração de acasalamento ao acaso e assim se mantêm. Esse equilíbrio é chamado de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde, em um loco com dois alelos, A_1 e A_2 , as frequências alélicas são

respectivamente p e q , dessa forma, as frequências genotípicas devem ser p^2 (A_1A_1), $2pq$ (A_1A_2) e q^2 (A_2A_2). Quando a heterozigosidade média observada em uma determinada população se difere significativamente da heterozigosidade esperada (diversidade genética) sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg, isso significa que existe alguma força evolutiva atuando na população e causando um desvio no acasalamento ao acaso (NEI, 1973; FRANKHAM *et al.*, 2006).

Forças evolutivas como fluxo gênico, mutação e seleção podem levar uma população a uma estruturação genética, que pode ser definida pela distribuição não aleatória dos alelos ou genótipos (VEKEMANS; HARDY, 2004). Os fatores que afetam a distribuição e a reprodução com certeza afetam a estrutura genética de uma espécie. Nas plantas, por exemplo, as dispersões de pólen e sementes são fatores importantes na determinação de sua estrutura genética, já que elas apresentam uma motilidade bastante limitada, dependendo dos modos e dos agentes de polinização e dispersão de sementes (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

A polinização por animais, por exemplo, depende da capacidade do animal em percorrer certas distâncias. Insetos menores percorrem distâncias mais restritas quando comparados a insetos maiores, ou seja, insetos capazes de percorrer maiores distâncias proporcionarão um maior fluxo gênico dentro ou entre populações e conseqüentemente ocorrerá uma diminuição da diferenciação genética e um aumento no grupo de vizinhança. Da mesma forma, a dispersão de sementes contribui para uma maior ou menor diferenciação genética (LOISELLE *et al.*, 1995). Quanto maior for a distância percorrida da semente em relação à planta genitora, menor a diferenciação genética entre as populações e maior será seu tamanho efetivo (N_e) em relação ao tamanho da amostra. O tamanho efetivo (N_e) de uma população é o número de indivíduos que, em uma população ideal, sofreria com a mesma magnitude os efeitos de fatores evolutivos (LOVELESS; HAMRICK, 1984). De modo geral, o tamanho efetivo populacional (N_e) mede a força da deriva genética (TEMPLETON, 2011) e frequentemente ele é menor que o tamanho real ou amostral. O tamanho efetivo populacional a ser estimado depende do atributo genético de interesse, podendo estar relacionado à variância nas frequências alélicas (tamanho efetivo de variância) e a quantidade de endogamia (tamanho efetivo de endogamia) presente em uma determinada população (HARTL; CLARK, 2010). O tamanho efetivo de endogamia (N_{ef}) demonstra o acúmulo de identidade por descendência dentro de uma população, ou seja, está diretamente ligado ao coeficiente de endogamia (TEMPLETON, 2011).

O sistema de acasalamento é tido como o principal fator para determinar a estrutura genética de uma população. (VEKEMANS; HARDY, 2004). Em espécies de plantas dioicas, por exemplo, os grupos de vizinhança são maiores e a diferenciação genética menor entre suas

populações, quando comparadas a espécies monoicas. No acasalamento misto, as proporções de alogamia e autogamia determinam a estrutura genética, mas tende a ter semelhanças com a estrutura da reprodução cruzada, pois não há necessidade de um grande número de cruzamentos para diminuir a diferenciação entre populações. Por outro lado, a presença de reprodução vegetativa é um fator que pode aumentar a diferenciação genética nas populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984; LOISELLE *et al.*, 1995; HARTL; CLARK, 2010). Segundo Wright, 1940 (*apud* LOVELESS; HAMRICK, 1984) a probabilidade de acasalamento entre os indivíduos está diretamente relacionada à distância geográfica entre eles ou à distância que seus propágulos podem alcançar no ambiente, conceito denominado isolamento por distância.

A estrutura genética espacial é, portanto, resultado de diversos processos como pressões de seleção ou eventos históricos, porém a causa mais prevalente é, provavelmente, a formação de estruturas de *pedigree* locais como resultado da dispersão limitada de genes, já que, no caso das plantas, a dispersão de pólen e de sementes tem uma distribuição frequentemente restrita. O uso de marcadores moleculares, nesse caso, permite uma avaliação quantitativa satisfatória da estruturação genética espacial e ainda novas inferências a respeito dos processos de isolamento por distância o que permite, por exemplo, traçar estratégias mais eficientes de amostragem (VEKEMANS; HARDY, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coleta

O material biológico foi constituído de tecido foliar de uma população natural de *Stryphnodendron adstringens*, localizada na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, que se encontra no Parque Estadual da Serra Dourada. O parque ocupa partes dos municípios de Mossâmedes, Cidade de Goiás e Buriti de Goiás, no estado de Goiás (Figura 3). O Parque Estadual da Serra Dourada foi criado em 2003 e conta com uma área aproximada de 30 mil hectares, sendo mais de 60% de sua área total dentro do município de Cidade de Goiás. Sua criação visa a preservação de nascentes, mananciais, da fauna e da flora, além das paisagens naturais e utilização para fins científicos, econômicos, técnicos e ambientais (UCB, 2019).

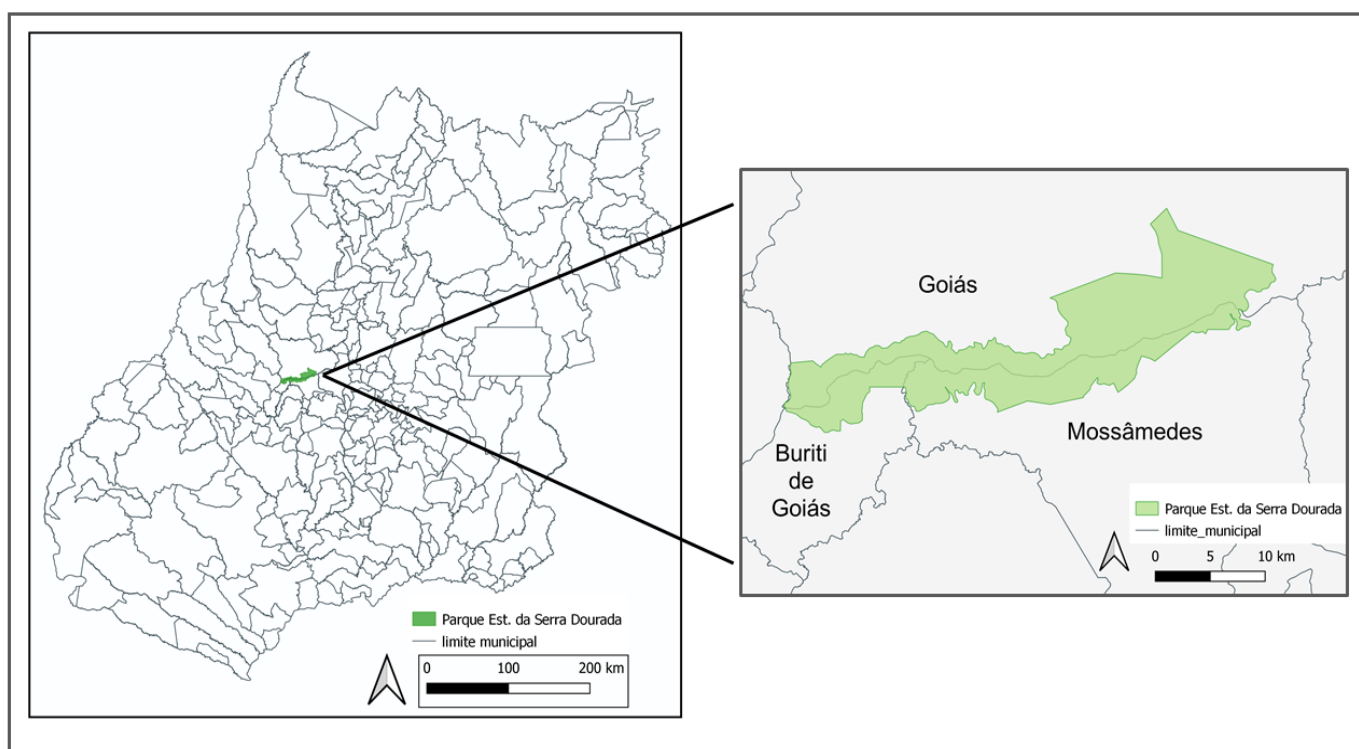


Figura 3. Localização do Parque Estadual da Serra Dourada no Estado de Goiás ocupando partes dos municípios de Mossâmedes, Cidade de Goiás e Buriti de Goiás

A coleta do material foi realizada em um único dia do mês de abril de 2019, onde foram coletadas amostras de tecido foliar de um total de 136 indivíduos. Não foi estabelecida uma

distância mínima entre os indivíduos coletados, alguns indivíduos estavam a uma distância tão próxima um do outro que receberam a mesma coordenada geográfica. Foram coletados todos os indivíduos encontrados durante o percurso de aproximadamente 2,3 km, praticamente em linha reta (Figura 4). As amostras de tecido foliar foram acondicionadas em sacos de papel pardo devidamente identificadas com o número do indivíduo e em seguida embaladas em sacos plásticos contendo sílica gel. Todos os indivíduos amostrados foram georreferenciados com GPS (*Geographical Positional System*).

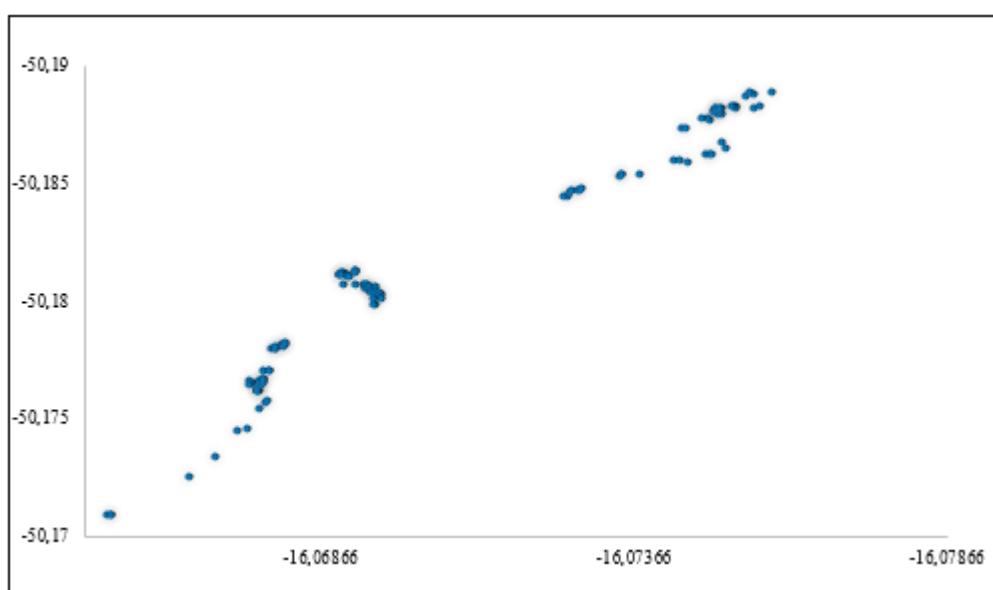


Figura 4. Distribuição (longitude x latitude) de indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* de uma população natural situada no Parque Estadual da Serra Dourada – Goiás.

4.2 Obtenção dos dados moleculares

A extração do DNA genômico foi realizada no Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal de Goiás (UFG), localizado no Instituto de Ciências Biológicas I (ICB1) do Campus Samambaia (Campus II) em Goiânia – Goiás. A extração foi realizada a partir de tecido foliar seguindo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), utilizando CTAB 2% (*brometo de cetiltrimetil amônio*) como detergente do tampão de extração. Das 136 amostras coletadas, 12 apresentaram falhas repetidas vezes durante o processo de extração do DNA genômico, dessa forma a extração foi realizada com sucesso em 124 indivíduos.

Logo após a extração, foi realizada a quantificação do DNA usando eletroforese

horizontal em gel de agarose a uma concentração de 1%, com tampão TBE 1X (Tris Borato EDTA), corado com brometo de etídio, utilizando Lambda (λ) *Ladder* de 10ng/ μ L, 20ng/ μ L, 50ng/ μ L, 100ng/ μ L e 200ng/ μ L como marcadores de massa molecular. O gel foi visualizado com luz ultravioleta e os padrões das bandas de DNA obtidas no gel foram comparadas visualmente com as bandas formadas pelos marcadores Lambda. Em seguida, o DNA foi diluído com água ultrapura até atingir a concentração de trabalho igual a 2,5ng/ μ L de DNA genômico, e então as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

Para a amplificação das regiões microssatélites, via PCR (Reação em cadeia da polimerase), foram utilizados nove pares de *primers* (iniciadores), *forward* e *reverse*, previamente desenvolvidos e otimizados especificamente para a espécie *S. adstringens* (BARATELI, 2018) (Tabela 1). O protocolo dos reagentes usados para a amplificação das regiões microssatélites, bem como suas concentrações e volumes estão especificados na tabela 2. A PCR ocorreu em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) de acordo com os seguintes estágios: I) estágio de desnaturação, ocorreu a 94°C por cinco minutos; II) estágio de anelamento, um minuto a 94°C, um minuto a temperatura de anelamento (T.A.) e mais um minuto a 72°C, esse estágio se repetiu 30 vezes (30 ciclos); III) estágio de extensão, ocorre a extensão final da molécula pela enzima *Taq* DNA polimerase a 72°C, ao final de 45 minutos a temperatura baixou para 4°C.

O produto amplificado via PCR foi checado por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose à concentração de 3%, corado com brometo de etídio, tampão TBE 1X (Tris Borato EDTA) e visualizado com luz ultravioleta. O padrão das bandas de DNA foi comparado visualmente ao marcador de peso molecular de 100bp (pares de base) Invitrogen®.

Após a confirmação da amplificação, foram construídas “placas-mães”, para a montagem das multiplex. Em cada “placa-mãe” foram colocados volumes que variaram de 2 μ L a 3 μ L do produto de cada PCR, dependendo da intensidade do padrão de bandas encontrado no gel. Cada poço da placa-mãe correspondeu a um indivíduo e, em cada poço, foi misturado o produto de todas as PCR’s correspondente à sua multiplex. Para a formação de cada multiplex, foram levadas em consideração a amplitude alélica de cada loco e a fluorescência de cada iniciador como demonstrado na tabela 3 (GONÇALVES, 2020; *no prelo*). Cada iniciador *forward* foi marcado em sua extremidade 5’ com um dos seguintes fluorocromos; VIC (verde), NED (amarelo), 6-FAM (azul) ou PET (vermelho).

Tabela 1. Sequência dos *primers*, desenvolvidos e otimizados para *Stryphnodendron adstringens* (Barateli, 2018), em cada loco, motivo de repetição das regiões microssatélites e temperatura de anelamento de cada loco.

Loco	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Motivo de repetição	T.A. (C°)
SadH1	F: AGTGCCTCTACTGATTTATGACCC R: CCAGGCGATTCAACCATATC	(GT) ₅	56
SadH5	F: GTGGTCTCTCTGCTGCCTTC R: ACAGGGATGAGCCAGAGCTA	(CT) ₁₄	54
SadH7	F: TAAAGGGTCATTATATGTGGCAA R: TTTCTGTAACCCCTTCGACCA	(CA) ₁₄	54
SadH9	F: AGTGAAGAAGAGCCACAG R: CCTGGAAGGTTGGAGAGTG	(CT) ₁₁	58
SadH11	F: TTAAGTCACGCCTCTTCGTC R: CTGTATAGTGAAGGCATGTTTCC	(AG) ₁₅	56
SadH13	F: CTTCCAGGTGCCTTGCTTAC R: TGCTCATCTGTTTCTTTGGTTC	(GT) ₁₄	56
SadH14	F: GAGACATCGTCCGAGGCTAA R: CTGACCCAAATCAGCACAGA	(TC) ₁₄	58
SadH16	F: TGGAGGAGGGAGTATAGGTGA R: ACTAGGGACACTGACGAGGC	(AACG) ₈	58
SadH18	F: ATGAGCTTGGATGGTTGATG R: TGGAAGGCTACGTGGAATTA	(TTAT) ₆	58

Tabela 2. Protocolo dos reagentes usados para a amplificação das regiões microssatélites em *Stryphnodendron adstringens*.

Reagentes	Volume (µL)
Água ultrapura	3,65
DNA (2,5ng/µL)	1,5
Primer forward (0,9 µM)	0,75
Primer reverse (0,9 µM)	0,75
Tampão de enzima Tp (10X) com MgCl ₂	1
BSA (25mg/ml)	1,3
dNTP's (2.5 µM)	0,9
TaqDNA polimerase (5 U)	0,15
TOTAL	10

Dessa forma, para cada multiplex foi aliquoteado 1µL da “placa-mãe” correspondente,

0,25 µL de marcador molecular padrão (600 LIZ) e 8,75 µL de formamida HI- DI (*Applied Biosystems*), obtendo-se uma solução com volume final de 10 µL, em cada poço. Essa solução foi desnaturada em termociclador por cinco minutos a uma temperatura de 95°C, logo depois ela foi colocada em *cooler* durante um minuto e, em seguida, as amostras foram injetadas no analisador semi-automático de DNA modelo ABI-3500 (*Applied Biosystems*), para a análise dos fragmentos e obtenção dos genótipos.

Tabela 3. Multiplex de aplicação (GONÇALVES, 2020; *no prelo*) para *Stryphnodendron adstringens* com o nome de cada loco, sua amplitude alélica e a fluorescência de cada *primer*.

Multiplex	Loco	Amplitude alélica (pb)	Fluorescência
Multiplex 1	SadH1	161-171	VIC
	SadH5	274-310	FAM
	SadH9	190-260	PET
	SadH11	306-340	VIC
	SadH18	260-268	NED
Multiplex 2	SadH7	148-168	VIC
	SadH13	201-255	FAM
	SadH14	241-269	PET
	SadH16	321-357	NED

A identificação dos fragmentos foi realizada por meio da detecção de sinal fluorescente. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados usando marcadores internos de tamanho padrão (*size standard*) marcados com fluorescência laranja (LIZ) (Life Technologies®), por meio da eletroforese conjunta para cada amostra genotipada. Os dados coletados automaticamente no programa *Data Collection* (*Applied Biosystems*), foram editados com o auxílio do programa *GeneMapper* versão 5.0 (*Applied Biosystems*), o que possibilitou a obtenção dos genótipos dos indivíduos avaliados.

4.3 Análises Estatísticas

4.3.1 Caracterização da Diversidade Genética

Para a análise descritiva da diversidade genética intrapopulacional de *S. adstringens* foram estimados os seguintes parâmetros genéticos: número total de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E), índice de fixação ou coeficiente de endogamia (f), o número efetivo de alelos por loco (A_e) e a diversidade genética máxima ($H_{m\acute{a}x}$). Esses parâmetros foram estimados para cada loco. O número total de alelos por loco (A), a heterozigosidade esperada (H_E) e o índice de fixação (f) foram obtidas pelo programa FSTAT 2.9.3.2 com nível de significância de 5%. Já a Heterozigosidade observada (H_O) e o número efetivo de alelos por loco (A_e) foram estimados pelo programa SPAGeDi 1.5 (*Spatial Pattern Analysis of Genetics Diversity*) (HARDY, 2002) com 5% de significância.

A heterozigosidade esperada (H_e), também chamada de diversidade genética, é o número de heterozigotos que se espera encontrar, considerando que os locos estejam sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg de acordo com NEI (1973). A diversidade genética máxima ($H_{m\acute{a}x}$) indica o valor máximo teoricamente esperado de diversidade genética (H_e) de acordo com o número observado de alelos. Essa estimativa foi calculada seguindo a fórmula: $H_{m\acute{a}x} = 1 - 1/A$, onde, A corresponde ao número de alelos encontrados no loco (HENNINK; ZEVEN, 1990).

O número efetivo de alelos por loco (A_e) obedece a expressão; $A_e = \frac{1}{1-H_e}$ e seu valor pode indicar a presença de alelos raros dentro da população (NIELSEN *et al.*, 2003 e VIEGAS *et al.*, 2011).

O índice de fixação (f) é uma estimativa do nível de endogamia dentro da população e também é chamado de coeficiente de endogamia. Ele mede a deficiência ou excesso de heterozigotos em cada loco e na população total, ou seja, mede os desvios das frequências genotípicas esperadas sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências genotípicas observadas (TEMPLETON, 2011).

Com o programa Identity 4.0 (WAGNER; SEFC, 1999) foi possível avaliar o poder discriminatório do conjunto total dos locos, através das estimadas de probabilidade combinada de identidade (PI) e a probabilidade de exclusão de paternidade (Q).

A probabilidade combinada de identidade (PI) é a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente na população terem seus genótipos idênticos (PAETKAU *et al.*, 1998). Já a probabilidade de exclusão de paternidade (Q), é a probabilidade de exclusão de uma falsa paternidade (Weir, 1996).

Também foi realizado o teste de aderência das frequências genotípicas, de cada um dos locos, ao equilíbrio de Hardy-Weinberg com o nível de significância de 5%, com o auxílio do

programa Cervus 3.0.7 (KALINOWSKI *et al.*, 2007). Foi aplicado ao teste, a correção de Bonferroni para evitar erros do tipo I, ou seja, rejeitar erroneamente a hipótese de que um loco não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg (KALINOWSKI *et al.*, 2007).

4.3.2 Tamanho efetivo de endogamia e taxa de fecundação cruzada

O tamanho efetivo de endogamia da população foi estimado a partir da fórmula proposta por Vencovsky, 1997:

$$\hat{N}_{ef} = \frac{n}{1 + \hat{F}}$$

onde:

$\hat{F}$ o valor da endogamia, ou índice de fixação, também simbolizado por f , e n o número de indivíduos amostrados.

A taxa de fecundação cruzada aparente foi estimada de acordo com a relação entre os índices de fixação: $t = (1 - \hat{F})/(1 + \hat{F})$, assumindo que a única causa de endogamia na população é proveniente da autofecundação, e a taxa de autofecundação foi estimada por: $s = 1 - t$ (WRIGHT, 1922).

4.3.3 Estrutura genética espacial

A avaliação da estrutura genética espacial foi realizada a partir do estimador de parentesco proposto por J. Nason com base em LOISELLE *et al.* (1995), que é o coeficiente de parentesco F_{ij} entre todos os pares possíveis de indivíduos mapeados da população, dentro de classes de distância. O cálculo do coeficiente de parentesco fundamenta-se na probabilidade de se amostrarem aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência (LOISELLE *et al.*, 1995; SEBBENN; SEOANE, 2005). Os valores foram calculados conforme descrito a seguir:

$$F_{ij} = \frac{\sum_l [\sum_a (\sum_{ci} \sum_{cj} (X_{lcia} - P_{1a})(X_{lcja} - P_{1a}) / \sum_{ci} \sum_{cj} 1) + \sum_a (P_{1a}(1 - P_{1a}) / (n_1 - 1))]}{\sum_l \sum_a (P_{1a}(1 - P_{1a}))}$$

onde:

X_{lcia} é uma variável indicadora ($X_{lcia} = 1$ se o alelo no cromossomo c no locus l do indivíduo i for

a , caso contrário $X_{lcia} = 0$);

P_{la} é a frequência do alelo a no locus de l na amostra de referência, n_1 é o número de cópias definidas na amostra no locus l (o número de indivíduos vezes o nível de ploidia menos o número alelos ausentes) e;

$\sum c_i$ representa a soma dos cromossomos homólogos do indivíduo i . Aqui, o termo envolvendo “ $n_1 - 1$ ” é uma correção de viés de amostragem.

A escolha do número de classes de distância foi determinada conforme especificado pelo manual do programa SPAGeDI 1.5, considerando apenas pares que satisfazem as seguintes condições: I) o número de pares de comparações dentro de cada intervalo de distância deve ser, aproximadamente, constante e maior que 100; II) a porcentagem de todos os indivíduos representados pelo menos uma vez no intervalo deve ser maior que 50%; III) o coeficiente de variação do número de vezes que cada indivíduo é representado deve ser menor ou igual a um (Tabela 4).

Tabela 4. Condições consideradas para escolha de seis classes de distância para análise de parentesco F_{ij} em uma população natural de *Stryphnodendron adstringens* a partir de nove locos microssatélites. **Número de pares:** número de pares de comparações dentro de cada intervalo de distância; **Partic. (%):** porcentagem de todos os indivíduos representados pelo menos uma vez no intervalo de distância; **C.V.:** coeficiente de variação do número de vezes que cada indivíduo é representado.

Classes de distância	1	2	3	4	5	6
Número de pares	1269	1270	1270	1270	1270	1270
Partic. (%)	100	100	91,9	96	98,4	70,2
C.V.	0,5	0,7	0,75	0,65	0,42	0,82

Tanto o coeficiente de parentesco F_{ij} como as distâncias entre as classes foram determinados pelo programa SPAGeDI 1.5 (Tabela 5). A consistência dos dados foi obtida por randomização com 10.000 permutações e análises das inclinações de regressão.

Tabela 5. Classes de distância utilizadas para análise de estrutura genética espacial em uma população natural de *Stryphnodendron adstringens* a partir de nove locos microssatélites. Distância máxima (metros) que define o intervalo entre as classes e distância média (metros) entre os pares observados.

Classes de distância	1	2	3	4	5	6
Distância máxima	111,3	384,2	581,6	1004,1	1302,1	2254,1
Distância média	49,2	244,6	492,5	824,4	1101,8	1542,7

Para confirmar a existência ou não de uma estrutura genética espacial foi construído um parentescograma. O parentescograma representa a relação entre a distância geográfica média e o grau de parentesco F_{ij} (LOISELLE *et al.*, 1995) entre os indivíduos. Para isso foram usadas as seguintes estimativas: distância espacial média entre os pares de indivíduos observados, valores dos coeficientes de parentesco observados antes das permutações, valor do parentesco médio após as permutações e o maior e menor valor do intervalo de confiança de 95%.

Para quantificar a força da estrutura genética espacial foi usada a estatística Sp , de acordo com a equação: $Sp = \frac{b}{F_1 - 1}$, onde b é a inclinação da regressão utilizando o logaritmo da distância espacial e F_1 é o coeficiente médio de parentesco entre os indivíduos da primeira classe de distância. A estatística Sp está, significativamente, relacionada ao sistema de acasalamento e à densidade populacional. Assim, Sp apresenta valores maiores em espécies autógamas e em baixas densidades populacionais (VEKEMANS & HARDY, 2004).

Para avaliar a dispersão de pólen e sementes foi estimada a vizinhança genética, N_b . A vizinhança genética expressa o equilíbrio entre a deriva genética local e o fluxo gênico numa população contínua, e pode ser representada pelas equações $N_b = F_1 - 1/b$ ou $N_b = 1/Sp$ (VEKEMANS; HARDY, 2004). Esse parâmetro também foi estimado com o uso do software SPAGeDI 1.5.

4.3.4 Análise de identidade (clones)

S. adstringens é uma espécie que apresenta reprodução por meio de propagação vegetativa, a fim de investigar a presença desse tipo de reprodução na população foi realizada uma análise de identidade usando o programa Cervus 3.0.7 (KALINOWSKI *et al.*, 2007). A análise de identidade permite a identificação de clones entre os indivíduos amostrados. Para que fosse declarada a correspondência exata entre os indivíduos, foram selecionados todos os locos analisados. Dessa forma, os indivíduos considerados clones apresentavam correspondência exata, ou seja, não havia nenhum loco incompatível entre eles. Quando dois genótipos são exatamente correspondentes, o programa computa as seguintes probabilidades: PID, que é a probabilidade de um indivíduo não relacionado ter esse genótipo e o PIDsib, que é a probabilidade de um irmão completo ter esse genótipo. As distâncias geográficas entre eles foram estimadas pelo programa SPAGeDI 1.5 (HARDY, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade genética

Para os nove locos analisados foram encontrados um total de 74 alelos e uma média de 8,2 alelos por loco. O número de alelos variou de dois a 20, em SadH1 e SadH9, respectivamente (Figura 5). A diversidade genética (H_E) variou de 0,085 a 0,832 nos locos SadH1 e SadH13, respectivamente, enquanto o valor médio foi igual a 0,624. Para a heterozigosidade observada (H_O) houve uma variação de 0,089 a 0,798 em SadH1 e SadH11, respectivamente, com média de 0,556.

A heterozigosidade máxima (H_{max}) apresentou o menor valor no loco SadH1 ($H_{max} = 0,500$) e o maior valor no loco SadH9 ($H_{max} = 0,950$), com proporção H_E/H_{max} de 17% e 78,21%, respectivamente. Entretanto, o no loco SadH11 obteve a proporção H_E/H_{max} mais alta dentre todos os locos e foi igual a 92,93%. Isso por que um loco com maior número de alelos nem sempre é o loco com maior diversidade, pois os valores da diversidade genética dependem da relação entre o número de alelos a sua distribuição nas frequencias relativas. A média da proporção H_E/H_{max} foi de 71,11%, indicando uma diversidade genética alta.

Os valores do índice de fixação (f) variaram de -0,127 a 0,425 nos locos SadH16 e SadH7, respectivamente. Porém, foram significativos apenas nos locos SadH7 e SadH13. O coeficiente de endogamia geral foi de 0,110 e significativo ($p < 0,05$). O número efetivo de alelos (A_e) variou de 1,09 a 5,95 nos locos SadH1 e SadH13, respectivamente, com média de 3,48.

As probabilidades de exclusão de paternidade (Q) por loco variou de 0,041 a 0,677 (SadH1 e SadH13), e a probabilidade de exclusão de paternidade total foi de 0,996. Assim, o conjunto de marcadores microssatélites é eficiente para excluir uma falsa paternidade, já que está dentro dos valores ideais (0,97 a 0,99). As probabilidades de identidade (PI) foram de 0,046 a 0,841 (SadH13 e SadH1) e a probabilidade de identidade total foi de $4,15 \times 10^{-8}$, que também é considerada satisfatória, pois está dentro dos valores ideais (próximos de zero) (Tabela 6).

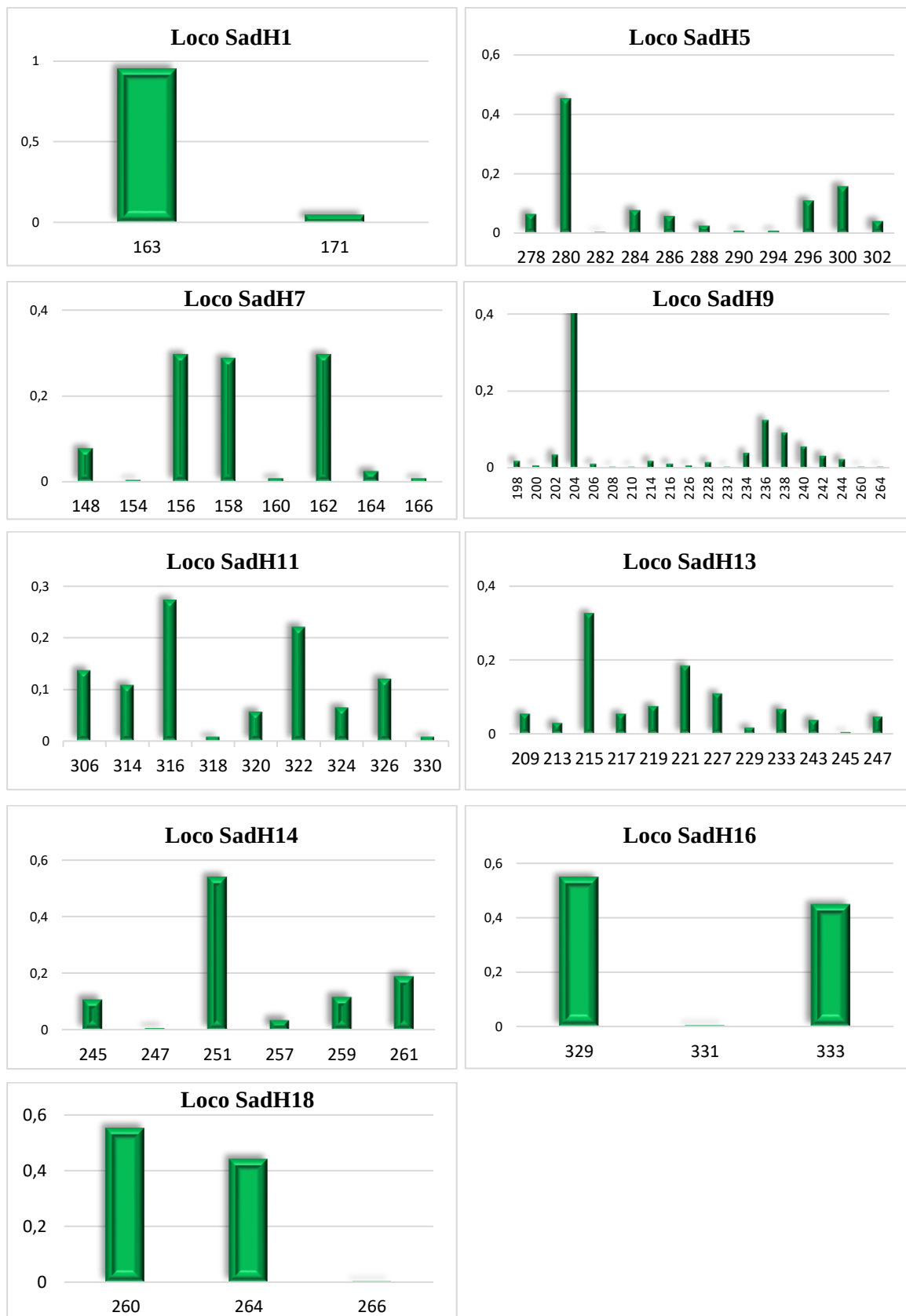


Figura 5. Gráfico da distribuição das frequências alélicas de nove locos microssatélites utilizados para análise genética em uma população natural de *Stryphnodendrom adstringens*. O eixo das ordenadas corresponde às frequências alélicas e as abscissas representam os alelos encontrados em cada loco.

Tabela 6. Caracterização da diversidade genética em nove locos microssatélites de uma população natural de *Stryphnodendron adstringens*. **N**: número de indivíduos; **A**: número de alelos por loco; **Ae**: número efetivo de alelos; **He**: heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; **Ho**: heterozigosidade observada; **Hmáx**: diversidade genética máxima; **He/Hmáx**: proporção de diversidade máxima **f**: índice de fixação intrapopulacional ou coeficiente de endogamia; **Q**: probabilidade de exclusão de paternidade; **PI**: probabilidades de identidade.

Locus	N	A	Ae	He	Ho	Hmáx	He/Hmáx(%)	f	Q	PI
SadH1	124	2	1,09	0,085	0,089	0,500	17,00	-0,042	0,041	0,841
SadH5	124	11	3,95	0,747	0,734	0,909	82,17	0,018	0,558	0,089
SadH7	122	8	3,84	0,741	0,426	0,875	84,69	0,425*	0,495	0,117
SadH9	124	20	3,89	0,743	0,742	0,950	78,21	0,002	0,572	0,084
SadH11	124	9	5,75	0,826	0,798	0,889	92,93	0,034	0,652	0,054
SadH13	120	12	5,95	0,832	0,700	0,917	90,76	0,159*	0,677	0,046
SadH14	124	6	2,84	0,648	0,565	0,833	77,76	0,129	0,419	0,165
SadH16	124	3	2	0,501	0,565	0,667	75,15	-0,127	0,191	0,372
SadH18	121	3	2	0,500	0,388	0,667	75,00	0,224	0,191	0,372
Média	123	8,22	3,48	0,6246	0,556	0,878	71,11	0,110*	0,996	4,15x10 ⁻⁸

(*) Indica valores significativos ao nível de 5%

Em Barateli (2018), foram amostrados 48 indivíduos oriundos de três populações de *S. adstringens*, com um conjunto de 16 marcadores microssatélites. Nesse estudo, as estimativas para o número de alelos por loco ($A = 7$), a heterozigosidade esperada ($H_e = 0,543$), a heterozigosidade observada ($H_o = 0,506$), a proporção de diversidade máxima ($H_e/H_{máx} = 65,5\%$), o índice de fixação intrapopulacional ($f = 0,050$) e o número efetivo de alelos ($A_e = 2,5$) foram todas inferiores às descritos no presente trabalho. Inclusive, o índice de fixação intrapopulacional global (f), relatado por Barateli (2018), não foi significativo, sugerindo a ocorrência de panmixia nessas populações. Esse valor difere muito da estimativa aqui relatada que foi igual a 0,110 e significativa, apontando um excesso de homozigotos. Essas divergências podem ser explicadas em razão do contexto de cada estudo (interpopulacional e intrapopulacional) e do tamanho da amostra.

Já no trabalho de Gonçalves (2020), que analisou 19 subpopulações de *S. adstringens*, com os mesmos marcadores microssatélites usados no presente estudo, obteve as seguintes estimativas médias: heterozigosidade esperada (H_e) igual a 0,594, a heterozigosidade observada (H_o) igual a 0,576 e o índice de fixação intrapopulacional (f) foi igual a 0,031 e não significativo. Porém, dentre as 19 subpopulações estudadas cinco obtiveram um índice de fixação positivo e significativo variando de 0,081 a 0,114.

As estimativas encontradas no presente estudo são próximas às relatadas por Branco e colaboradores (2010), que realizaram um estudo com cinco populações de *S. adstringens*, utilizando microssatélites transferidos de diversas espécies arbóreas. Nesse trabalho, os autores consideraram que a estimativa de heterozigosidade observada ($H_o = 0,476$) se encontrava dentro do esperado, e que a diversidade genética ($H_e = 0,714$) poderia ser considerada boa, quando comparadas a outras espécies arbóreas tropicais. No entanto, o coeficiente de endogamia encontrado por eles foi mais alto ($f = 0,291$) em relação a essas espécies. Esses dados levaram os autores a concluir que havia a fixação de alelos dentro dessas populações e que a diversidade genética era grande em decorrência, provavelmente, da dispersão de pólen ou sementes serem eficientes a grandes distâncias.

Quando comparado a outras espécies arbóreas do Cerrado, pertencentes à família Fabaceae, como *Dipteryx alata* ($H_e = 0,451$; $f = -0,224$) (COLLEVATTI *et al.*, 2010), *Hymenaea stigonocarpa* ($H_e = 0,554$; $f = -0,009$) (GONÇALVES *et al.*, 2019) e *Pterodon emarginatus* ($H_e = 0,463$ $f = 0,144$) (SANTANA, 2014), *S. adstringens* apresentou valores mais altos de diversidade genética ($H_e = 0,624$) e de coeficiente de endogamia ($f = 0,110$).

Pôde-se verificar, assim, que a diversidade genética dentro da população é alta e está dentro do esperado para espécies do Cerrado, que também usaram marcadores microssatélites

para análises populacionais. Os trabalhos com *S. adstringens*, incluindo esse, apresentam os maiores índices de diversidade genética (H_e) dentre as espécies aqui comparadas. Em dois deles, incluindo o presente trabalho, o coeficiente de endogamia (f) aponta a existência do cruzamento entre indivíduos aparentados dentro da população (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre os valores de H_e : heterozigosidade esperada; H_o : heterozigosidade observada e f : coeficiente de endogamia entre espécies arbóreas do Cerrado e *Stryphnodendron adstringens*.

Espécie	H_e	H_o	f	Autor
<i>Dipteryx alata</i> (Fabaceae)	0,451		-0,224*	COLLEVATTI <i>et al.</i> , 2010
<i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Fabaceae)	0,554	0,495	0,231	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2019
<i>Pterodon emarginatus</i> (Fabaceae)	0,563	0,463	0,144	SANTANA, 2014
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	0,714	0,476	0,291*	BRANCO <i>et al.</i> , 2010
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	0,543	0,506	0,050	BARATELI, 2018
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	0,589	0,575	0,025	GONÇALVES, 2020
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	0,624	0,556	0,110*	PRESENTE TRABALHO

* Valores significativos

5.2 Tamanho efetivo de endogamia e taxa de fecundação cruzada

O tamanho efetivo populacional de endogamia (N_e) encontrado para *S. adstringens* foi de 111,72 para uma amostra de 124 indivíduos. Esse valor corresponde a uma representatividade genética (N_e/n) igual a 0,90. Ou seja, se essa população fosse uma população ideal panmítica, o número de indivíduos nela seria correspondente a 90% da amostra. Um tamanho efetivo próximo ao tamanho amostral indica que não há a ocorrência de deriva genética (TEMPLETON, 2011).

A taxa de fecundação cruzada aparente foi de 0,80 e a taxa de autofecundação foi de 0,20; demonstrando que, *S. adstringens* é uma espécie de sistema reprodutivo misto. Porém, Gonçalves (2020), encontrou taxas de fecundação cruzada aparente, em 19 populações, que variaram de 0,79 (sistema misto) até 1,43 (alógama). Isso demonstra que a taxa de fecundação cruzada pode variar em relação a população estudada.

5.3 Estrutura genética espacial

Na análise do parentescograma, relação do parentesco (F_{ij}) e a distância geográfica (Figura 6), foi observado que a primeira classe de distância se encontra acima do intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de parentesco, na primeira classe, foi igual a 0,0176 e a distância média entre os pares de indivíduos comparados foi de 49 metros. Esse resultado mostra que indivíduos localizados espacialmente próximos são mais aparentados. Essa estruturação genética espacial ocorre em decorrência da dispersão de sementes próximas à planta matriz, pois a dispersão autocórica é o principal mecanismo dispersor nessa espécie (PILON *et al.*, 2015), favorecendo também o cruzamento entre indivíduos aparentados. Entretanto, a segunda, terceira, quarta e quinta classes de distância se mantêm dentro do intervalo de confiança. Dessa forma, não é possível considerar que exista uma estruturação genética espacial significativa. Já, na sexta classe de distância, houve novamente uma queda no coeficiente de parentesco de -0,00759 para -0,01438 e a distância média que separa os indivíduos da sexta classe é de 1542 metros (Tabela 8). Este resultado demonstra que o aumento da distância geográfica entre os pares de indivíduos contribui para a diminuição de parentesco entre eles.

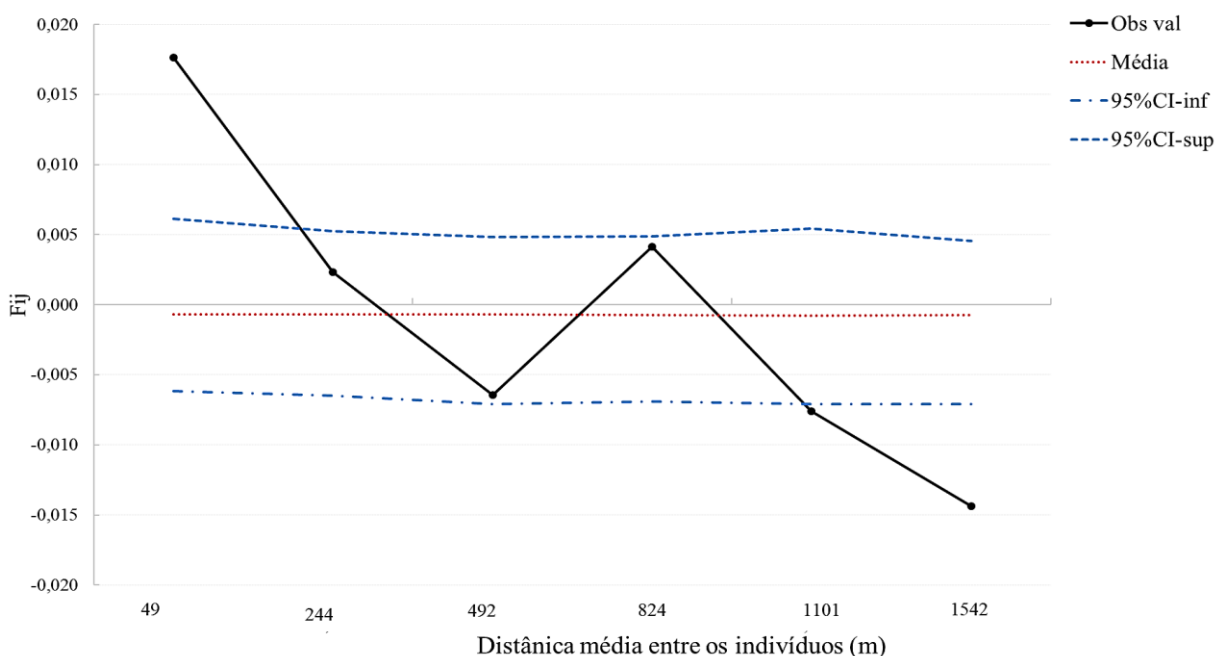


Figura 6. Parentescograma: relação coeficiente de parentesco (F_{ij}) e distância média entre os indivíduos dentro de seis classes de distância em população natural de *Stryphnodendron adstringens* localizada do Parque Estadual da Serra Dourada – Goiás.

Tabela 8. Estimativas usadas para a construção do parentescograma: **Classes de distância:** seis classes de distância, **Distância média** (metros): entre os pares observados dentro de cada classe de distância; **Valores observados:** coeficientes de parentesco observados antes dos testes de permutação; **Valor médio:** média do coeficiente de parentesco após os testes de permutação; **I.C. - 95% sup.:** maior valor do do intervalo de confiança de 95% e **I.C. - 95% inf.:** menor valor do do intervalo de confiança de 95%.

Classes de distância	1	2	3	4	5	6
Distância média	49,2	244,6	492,5	824,4	1101,8	1542,7
Valores observados	0,01762	0,00231	-0,00646	0,00415	-0,00759	-0,01438
Valor médio	-0,00071	-0,00070	-0,00069	-0,00072	-0,00077	-0,00071
I.C. - 95% sup.	0,00615	0,00527	0,00483	0,00489	0,00544	0,00456
I.C. - 95% inf.	-0,00618	-0,00647	-0,00708	-0,00692	-0,00708	-0,00707

A análise de estrutura genética espacial, quantificada pela estatística Sp , foi igual a 0,0095. Para estimar a dispersão de pólen e sementes foi utilizada a vizinhança genética (Nb) que foi igual a 105,3. Quando comparada a outras espécies do Cerrado como *Caryocar brasiliense* ($Sp = 0,0116$, $Nb = 86,20$), *Dipteryx alata* ($Sp = 0,0172$, $Nb = 58,09$) (COLLEVATTI *et al.*, 2010) e *Eugenia dysenterica* ($Sp = 0,0143$, $Nb = 69,93$) (BARBOSA, 2014), *S. adstringens* apresentou estrutura genética espacial mais fraca, se aproximando mais dos valores encontrados para *Tibouchina papyrus* ($Sp = 0,0085$ e $Nb = 118,05$) (Collevatti *et al.*, 2010).

A dispersão de pólen e sementes em *S. adstringens*, estimada através de (Nb) mostra que, pelo menos um dos sistemas de dispersão de pólen ou de sementes devem ser eficientes. Contudo, a baixa quantidade de frutos produzidos em *S. adstringens* não é limitada pelo comportamento do polinizador, mas sim pela disponibilidade de recursos que promove um aborto seletivo de sementes de baixa qualidade provenientes, provavelmente, de autofecundação (ORTIZ *et al.*, 2003). Sendo assim, é provável que a dispersão de pólen seja responsável pelo tamanho da vizinhança genética, mantendo o fluxo gênico dentro da população. O Sp de 0,0095 é maior que os valores médios de polinização pelo vento ($Sp = 0,0064$) e menor que o de polinização por animais ($Sp = 0,0171$) encontrados por Vekemans e Hardy (2004), o que confirma que a dispersão de pólen contribui de forma significativa para a distribuição dos genes nessa população.

A estrutura genética espacial aqui quantificada em $Sp = 0,0095$ pode ser dita como moderada, partindo da variação de $Sp = 0,00031$ que indica a ausência de estruturação genética espacial e $Sp = 0,263$ presente em uma espécie predominantemente autógena (VEKEMANS; HARDY, 2004).

É importante ressaltar que durante a coleta no Parque Estadual da Serra Dourada, foi observado que a população de *S. adstringens* apresentava uma distribuição agregada, formando

grupos de indivíduos intercalados por grupos de *Stryphnodendron polyphyllum*. Não foi observada a existência das duas espécies em um mesmo espaço, parecendo existir algum tipo de competição entre elas. Alguns grupos de *S. adstringens* apresentaram, entre si, um espaçamento de mais 500 metros (Figura 7). Esse fato pode ter contribuído para que, ainda que moderada, exista uma estruturação genética espacial na população de estudo. Já que o espaço entre os grupos de *S. adstringens* pode interferir na troca de pólen entre os indivíduos de grupos “diferentes”, aumentando a distância de vôo que os agentes polinizadores devem percorrer. Uma vez que, o fluxo gênico está diretamente relacionado a capacidade que o polinizador tem em percorrer grandes distâncias (LOISELLE *et al.*, 1995).

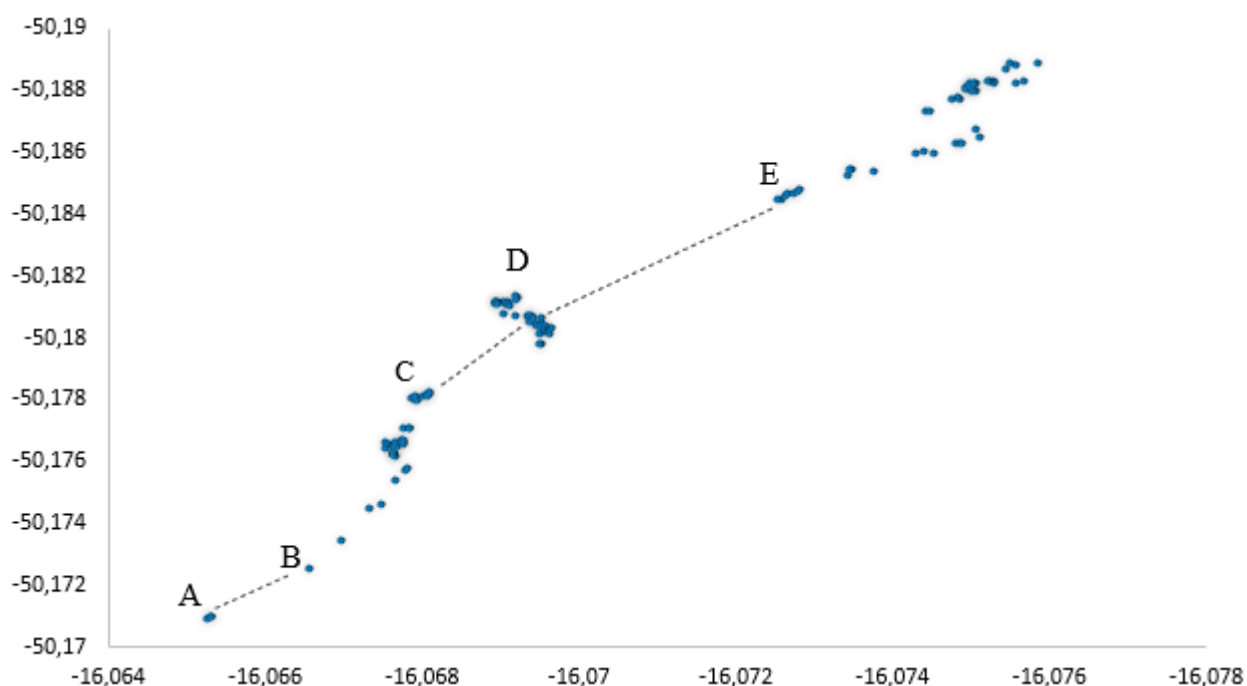


Figura 7. Distribuição de *Stryphnodendron adstringens* intercalados por grupos de *Stryphnodendron polyphyllum*. Os pontos azuis indicam grupos de *Stryphnodendron adstringens* e a linha pontilhada o espaço que separa esses grupos. O eixo das ordenadas representa as coordenadas de Longitude e o eixo das abscissas a latitude. Distâncias entre os pontos: A/B = 218 m; C/D = 297 m; D/E = 543 m.

5.4 Análise de identidade genética (clones)

Dentre os 124 indivíduos analisados, foram encontrados dez conjuntos de clones, onde cada conjunto variou entre três e quatro indivíduos com genótipos idênticos entre si para os nove locos usados (Tabela 9). A distância espacial entre os pares variou de zero a 92,06 metros resultando em uma média geral de 14,35 metros. Porém, a maioria dos pares tem uma distância

entre si menor que dez metros (Figura 8). Em alguns casos, os pares idênticos, se apresentaram tão próximos que não foi possível georreferenciar um dos pares, assim, cada membro do par recebeu a mesma coordenada geográfica, como no caso dos pares 2 – 3 e 12 – 13 (Tabela 9). Geralmente espécies com esse tipo de reprodução vegetativa, por rebrota de raízes, não se dispersam por distâncias muito grandes, Penha (1998), por exemplo, verificou uma distância máxima de seis metros e Moreno (2009) de 16,02 m de distância entre os clones.

Tabela 9. Dez conjuntos de clones em uma amostra de 124 indivíduos a partir de nove locos microsatélites numa população natural de *Strynodendron adstringens*. Pares de indivíduos de *Strynodendron adstringens* com genótipos idênticos para os nove locos analisados, distância espacial (m) entre os pares, **pID**: probabilidade de um indivíduo não relacionado ter esse genótipo e **pIDSib**: probabilidade de um irmão completo ter esse genótipo.

Conjunto de clones	Pares de indivíduos	Distância espacial	pID	pIDSib
1	1, 2	8,57	2,50x10 ⁻⁹	1,57x10 ⁻³
	1, 3	8,57		
	2, 3	0		
2	10, 20	83,33	6,88x10 ⁻¹⁰	9,26x10 ⁻⁴
	10, 9	9,42		
	20, 9	92,06		
3	12, 13	0	3,45x10 ⁻⁹	1,13x10 ⁻³
4	26, 28	5,94	9,76x10 ⁻⁸	1,79x10 ⁻³
5	33, 34	3,09	1,88x10 ⁻¹⁰	9,84x10 ⁻⁴
	33, 35	4,28		
	34, 35	2,97		
6	36, 38	15,44	2,31x10 ⁻⁹	9,33x10 ⁻⁴
7	52, 54	6,85	3,40x10 ⁻⁷	2,56x10 ⁻³
8	83, 84	4,28	2,13x10 ⁻⁸	1,69x10 ⁻³
9	87, 88	3,09	9,15x10 ⁻⁹	1,54x10 ⁻³
10	115, 116	2,97	2,31x10 ⁻⁹	1,53x10 ⁻³
	115, 117	4,28		
	116, 117	3,09		

A reprodução vegetativa por raízes gemíferas ocorre, geralmente, em espécies que se encontram em habitats que apresentam perturbações ambientais, de caráter natural ou antrópico, como o fogo por exemplo, que é comum no bioma Cerrado. Dessa forma, a propagação vegetativa contribui para a recomposição da área atingida pela queimada (PENHA, 1998). Como *S. adstringens* promove o aborto seletivo de sementes originadas de autofecundação (ORTIZ *et al.*,

2003), isso sugere que esses indivíduos detectados como clones sejam originados por reprodução vegetativa. Além disso, as probabilidades de indivíduos não relacionados (pDI) terem os genótipos encontrados entre os pares de clones são bastante reduzidas, assim como as probabilidades de um único irmão completo (pDI_{sib}) ter esse genótipo.

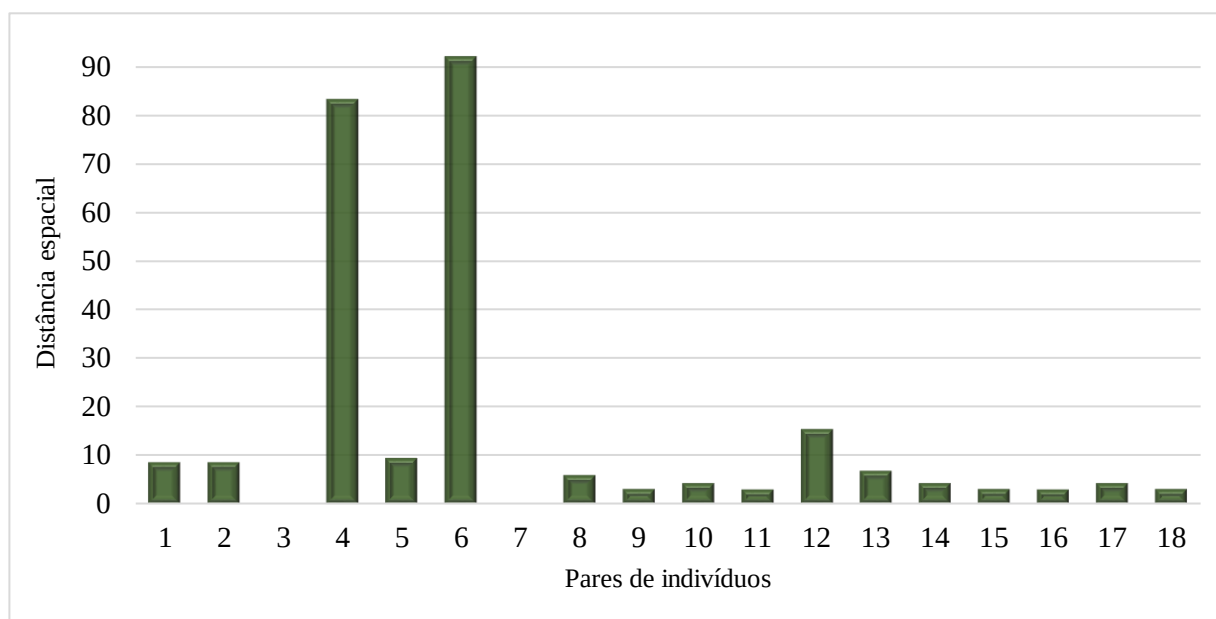


Figura 8. Gráfico da comparação das distâncias espaciais (m) entre os 18 pares de indivíduos dentro de dez conjuntos de indivíduos de genótipos idênticos em uma população natural de *Stryphnodendron adstringens* a partir da análise de nove locos microsatélites.

Estudos a respeito da reprodução vegetativa em *S. adstringens* ainda são muito escassos, o que torna essa discussão bastante limitada. Contudo, pode-se notar que esse tipo reprodução parece estar presente nessa população. Apesar de se encontrar em uma área de preservação ambiental, o Parque Estadual da Serra Dourada tem um histórico de perturbação ambiental em decorrência dos recorrentes episódios de queimadas (LIMA, 2004). Algumas vezes as queimadas se transformam em grandes incêndios, geralmente causados por queimadas que se iniciam em latifúndios ou nas estradas próximas ao Parque (CARVALHO, 2009). Desde a sua criação, em abril de 2003, o parque já sofreu pelo menos cinco incêndios, ocorridos nos meses de agosto ou setembro dos anos de 2004, 2010, 2014, 2017 e 2019 (UCB, 2019).

Com base em todos os dados aqui apresentados foi possível verificar que existe uma diversidade genética alta nessa população, com 71% de heterozigosidade máxima esperada, e uma heterozigosidade esperada (H_e) de 0,624. O tamanho do grupo de vizinhança genética demonstrou que a dispersão de pólen na população é eficiente. A estrutura genética espacial

encontrada mostra que a autocoria é o principal meio dispersor de sementes e que indivíduos mais próximos tem maior probabilidade de serem aparentados ou até idênticos, pois existe a ocorrência de clones na população. Dessa forma, é possível recomendar uma distância de pelo menos 49 metros entre os indivíduos para pontos de coleta que vise a formação de bancos de germoplasma. Assim, é possível garantir uma amostragem que contemple a diversidade genética presente nessa população e evitar amostrar indivíduos aparentados ou mesmo idênticos.

6 CONCLUSÃO

- A população de *S. adstringens* apresenta uma diversidade genética alta, representando 71% da heterozigosidade máxima esperada;
- O conjunto de marcadores microssatélites foi eficiente para excluir uma falsa paternidade e a probabilidade de identidade total também foi considerada satisfatória, dentro dos valores ideais (próximo a 0,99 e próximo da nulidade);
- *S. adstringens* é uma espécie de sistema reprodutivo misto, com fecundação cruzada e reprodução vegetativa;
- O tamanho do grupo de vizinhança indica que a dispersão de pólen é eficiente para manter alta diversidade;
- A população apresenta uma estruturação genética espacial moderada. Indivíduos mais próximos são mais aparentados, provavelmente em decorrência da dispersão por ~~autocria~~ ^{autocria} e da distribuição intercalada com *Stryphnodendron polyphyllum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. M. DE S.; CAMARGO, A. J. A. **Cerrado e Caracterização**. EMBRAPA, 2004.
- BARATELI, L. O. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão - Fabaceae)**. 2018. 55f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2018.
- BARBOSA, A. C. O. F. **Estrutura genética e sistema de cruzamento em *eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae)**. 2014. 126 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, 2014.
- BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational Dynamics of Microsatellites. p. 250–266, 2010.
- BORGES FILHO, H. C.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Revista Árvore**, v. 27, n. 5, p. 735–745, 2003.
- BRANCO, E.A.; ZIMBACK, L.; LIMA, A.B.; MORI, E.S.; HIDEYO, A. Estrutura Genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.). Disponível em: <<https://smastr16.blob.core.windows.net/iflorestal/RIF/SerieRegistros/IFSR42/IFSR42.pdf>>, pp. 31–37. 2010.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Caderno do extrativista: Boas práticas para o extrativismo sustentável orgânico Caderno do extrativista**, Brasília, 2017.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y., MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, R. P. Z.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microssatélites em espécies vegetais. **Biotecnologia, Ciência e desenvolvimento**, v. 30, 2003.
- CARVALHO, J. X. **Fogo no cerrado: causas e consequências da ação do fogo no cerrado no município de goiás**. 2009. 106 f. Monografia (Licenciatura em Geografia) – Universidade Estadual de Goiás, Unidade Cora Coralina, 2009.
- COLLEVATTI, R. G.; LIMA, J. S.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. C. Spatial genetic structure and life history traits in cerrado tree species: Inferences for conservation. **Natureza & Conservação** v. 8, n. 1, p. 54–59, 2010.
- DE MOURA, T. M.; ALEXANDRE, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S.; OLIVEIRA, G. C. X., PAULO P. K. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, n. 82, p. 143–150, 2009.
- 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.; MELO, A. C. G.; BOAS, O. V., CONTIERI, W. A., RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. São Paulo: SMA, 2011.

- ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.
- FELFILI, J. M. et al. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 1, p. 83–90, 1999.
- FERREIRA, É. C.; SILVA, J. L. L.; SOUZA, R. F. As Propriedades Medicinais E Bioquímicas Da Planta *Stryphnodendron Adstringens* “Barbatimão”. **Perspectivas Online - Biológicas e Saúde**, v. 3, n. 11, p. 14–32, 2013.
- FRANKHAM, RICHARD; BALLOU, JONATHAN D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: SBG - Sociedade Brasileira de Genética, 2006.
- GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MESA-VALLE, C.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Trends in plant research using molecular markers. **Planta**, v. 247, n. 3, p. 543–557, 2018.
- GONÇALVES, A. R.; CHAVES, L. J.; DE CAMPOS TELLES, M. P. Genetic variability and effective population size in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae) germplasm collection: tools for breeding programs and genetic conservation. **Genetica**, v. 147, n. 5–6, p. 359–368, 2019.
- GONÇALVES, A. R.. **Variabilidade genética e conservação de *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae)**. 2020. 106f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2020.
- GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. How are pollination and seed dispersal modes in cerrado related to stratification? Trends in a cerrado sensu stricto woodland in Southeastern Brazil, and a comparison with neotropical forests. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 3, p. 434–445, 2018.
- HARDY, O. J. & X. V. **SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels**. Molecular Ecology Notes, 2002.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 659.
- HENNINK, S.; ZEVEN, A. C. The interpretation of Nei and Shannon-Weaver within population variation indices. **Euphytica**, v. 51, n. 3, p. 235–240, 1990.
- HOWE, H. F.; SMALLWOOD, J. Ecology of seed dispersal. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, v.13, p.201- 228, 1982.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T. C. Revising howcomputer program Cervus accommodates genotyping error increase success in paternity assignment.**Mol. Ecol.**, 2007.
- LANCHOTI FIORI, G. M. et al. Antimicrobial Activity and Rates of Tannins in *Stryphnodendron adstringens*; Mart. Accessions Collected in the Brazilian Cerrado. **American Journal of Plant Sciences**, v. 04, n. 11, p. 2193–2198, 2013.
- LIMA, F. R. **Parque estadual da serra dourada:uma opção para o ecoturismo, seu cenário atual e perspectivas futuras**. 2004. 157 f. **Monografia (Especialização em Ecoturismo) – Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo, 2004.**

LOISELLE, B. A., SORK, V. L., NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, n. 11, p. 1420–1425, 1995.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol . 15 (1984), pp . 65-95
Published by : Annual Reviews Stable URL : <http://www.js.> **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, n. 1984, p. 65–95, 1984.

MARTINS, L. P.; MATTOS, P. P. DE; BRAZ, E. M. Crescimento de *Stryphnodendron adstringens* no bioma Cerrado, Formosa, GO. **COMUNICADO TÉCNICO 357 EMBRAPA**, 2015.

MEIRA, M. R. et al. Barbatimão: Ecologia, Produção De Tanino E Potencial Sócio Econômico Na Região Norte Mineira. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 466–494, 2013.

MELO, S. W. C. Extrativismo Vegetal como Estratégia de Desenvolvimento Rural no Cerrado. p. 197, 2013.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 8 out. 2019.

MORENO, M. A. **Estrutura genética e diversidade clonal de jotobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mat. ex Hayne) em duas populações do Cerrado do Estado de São Paulo**. 2009. 115f. Dissertação (Mestrado em Recursos florestais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3321–3323, 1973.

NIELSEN, R.; TARPY, D. R.; REEVE, H. K. Estimating effective paternity number in social insects and the effective number of alleles in a population. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 3157–3164, 2003.

OLIVEIRA, E. J., PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I., VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. v. 307, p. 294–307, 2006.

ORTIZ, P. L.; ARISTA, M.; OLIVEIRA, P. E.; TALAVERA, Pattern of Flower and Fruit Production in *Stryphnodendron adstringens*, an Andromonoecious Legume Tree of Central Brazil. **Plant Biology**, v. 5, n. 6, p. 592–599, 2003.

PAETKAU, D. et al. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Mol Ecol.**, 1995

PENHA, A. S. **Propagação vegetativa de espécies arbóreas a partir de raízes gemíferas: representatividade na estrutura fitossociológica e descrição dos padrões de rebrota de uma comunidade florestal, campinas, são paulo**. 1998. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - área de Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 1998.

PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

- PILON, N. A. L.; DURIGAN, G. Critérios para indicação de espécies prioritárias para a restauração da vegetação de cerrado. *Sci. For.*, Piracicaba, v. 41, n. 99, p. 389-399, 2013.
- PILON, N. A. L.; UDULUTSCH, R. G.; DURIGAN, G. Padrões fenológicos de 111 espécies de Cerrado em condições de cultivo. *Hoehnea*, v. 42, n. 3, p. 425-443, 2015.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v. 9, n. 2, p. 221-238, 2004.
- RIZZINI, C. T.; HERINGER, E. P. Estudos sobre os sistemas subterrâneos difusos de plantas campestres. *Acad. Brasileira de Ciências*, v. 38, p. 85 – 112.
- SANTANA, A. R. **TRANSFERIBILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MULTIPLEX DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE)**. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2007.
- SANTOS, S.; COSTA, W. F.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRIA, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*, 2002.
- SCALON, V.R. **Revisão taxonômica do gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae)**. 2007. 273 f. Tese (Doutorado em Ciências: Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, v. 109, n. 6, p. 365-371, 2000.
- SCHLÖTTERER, C. Opinion: The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, v. 5, n. 1, p. 63-69, 2004.
- SEBBENN, A.M.; SEOANE, C. E. S. Estimative of Inbreeding Effective Size By Genetic Markers. *R. Árvore*, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2005.
- SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. *Acta bot. bras.*, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.
- SOUZA, V.C.; GIBAU, A. *Stryphnodendron* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB19133>>. Acesso em: 19 mai. 2020
- TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Ribeirão Preto, SP: Sociendade Brasileira de Genética, 2011.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto, SP: Sociendade Brasileira de Genética, 2017.
- UCB.SOCIOAMBIENTAL.ORG/. **Unidades de conservação no Brasil**. Disponível em: <<https://uc.socioambiental.org/pt-br/arp/3535#pesquisa>>. Acesso em: 8 out. 2019.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, v. 13, n. 4, p. 921-935, 2004.

VENCOVSKY, R. Biometric approaches for molecular markers estimation of effective population size. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY, Piracicaba, 1997. Proceedins. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. p. 233-234.

VIEGAS, M. P.; SILVA, C. L. S. P.; MOREIRA, J. R., CARDIN, L. T., AZEVEDO, V. C. R., CIAMPI, A. Y.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética e tamanho efetivo de duas Populações de *Myracrodruon urundeuva* FR. all., sob conservação EX situ. **Revista Arvore**, v. 35, n. 4, p. 769–779, 2011.

WAGNER, H. W; SEFC, K. M. **IDENTITY, 1.0. Centre for Applied Genetics. University of Agricultural Sciences.** Vienna, 1999.

WATSON, JAMES D.; MYERS, RICHARD M.; CAUDY, AMY A.; WITKOWSKI, J. A. **DNA Recombinante: genes e genomas.** 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

WEIR, B. S. Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data. **Sinauer Associates Inc.**, Sunderland, 1996.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist**, 56:330–338, 1922.

APÊNDICE 1. Genótipos dos indivíduos da população de *Stryphnodendron adstringens* do Parque Estadual da Serra Dourada e sua posição espacial em latitude e longitude.

Nº indivíduo	Indivíduo	Latitude	Longitude	SadH1		SadH5		SadH7		SadH9		SadH11		SadH13		SadH14		SadH16		SadH18	
1	SDOGO_01	-16,06525	-50,170917	163	163	278	296	158	158	204	204	316	316	209	213	251	251	329	333	260	260
2	SDOGO_02	-16,065306	-50,170972	163	163	278	296	158	158	204	204	316	316	209	213	251	251	329	333	260	260
3	SDOGO_02A	-16,065306	-50,170972	163	163	278	296	158	158	204	204	316	316	209	213	251	251	329	333	260	260
4	SDOGO_03	-16,066556	-50,172556	163	171	286	288	164	164	202	238	314	322	215	243	245	251	329	333	260	264
5	SDOGO_04	-16,066972	-50,173444	163	163	280	300	158	160	204	204	306	324	233	243	245	251	329	329	264	264
6	SDOGO_05	-16,067333	-50,1745	163	163	284	286	156	162	204	204	314	316	215	221	259	261	329	329	260	260
7	SDOGO_06	-16,067472	-50,174611	163	171	280	280	162	162	200	200	314	322	227	233	251	261	329	333	260	264
8	SDOGO_07	-16,067667	-50,175417	163	163	280	280	158	158	204	204	316	318	227	233	251	251	329	333	264	264
9	SDOGO_08	-16,067778	-50,175722	163	163	280	302	148	158	236	240	306	316	227	247	251	251	329	333	260	260
10	SDOGO_09	-16,067806	-50,175806	163	163	280	302	148	158	236	240	306	316	227	247	251	251	329	333	260	260
11	SDOGO_10	-16,067667	-50,176194	163	171	280	284	156	162	204	204	316	320	215	221	251	251	333	333	260	260
12	SDOGO_11	-16,067639	-50,176222	163	163	280	284	158	162	236	240	314	314	219	221	251	251	329	333	260	264
13	SDOGO_11A	-16,067639	-50,176222	163	163	280	284	158	162	236	240	314	314	219	221	251	251	329	333	260	264
14	SDOGO_11B	-16,067639	-50,176222	163	163	278	302	148	158	236	240	306	316	227	247	251	251	329	333	?	?
15	SDOGO_11C	-16,067639	-50,176222	163	163	278	302	148	158	236	240	306	316	227	247	251	251	329	333	?	?
16	SDOGO_13	-16,067639	-50,176278	163	163	280	296	156	158	204	236	314	316	213	215	251	259	329	329	264	264
17	SDOGO_14	-16,067639	-50,176361	163	163	280	294	162	162	204	238	306	322	215	215	261	261	329	333	260	260
18	SDOGO_15	-16,067667	-50,176472	163	163	280	302	148	158	260	264	306	316	227	247	251	261	329	333	260	260
19	SDOGO_16	-16,067694	-50,1765	163	163	280	302	148	158	204	236	306	316	?	?	251	261	329	333	260	260
20	SDOGO_17	-16,06775	-50,176583	163	163	280	302	148	158	236	240	306	316	227	247	251	251	329	333	260	260
21	SDOGO_18	-16,067639	-50,176556	163	163	280	302	148	158	204	236	306	316	221	227	251	259	329	333	260	260
22	SDOGO_19	-16,067667	-50,176639	163	163	280	302	148	158	204	236	306	316	?	?	251	251	329	333	260	260
23	SDOGO_20	-16,067528	-50,176611	163	163	280	302	148	158	204	236	306	316	227	247	251	261	329	333	260	260
24	SDOGO_21	-16,067556	-50,176556	163	163	280	280	156	156	204	244	306	324	215	221	259	261	329	333	260	264
25	SDOGO_22	-16,067528	-50,176444	163	163	278	300	156	158	204	204	306	322	227	233	251	251	333	333	260	260
26	SDOGO_23	-16,06775	-50,176639	163	163	280	300	156	156	204	238	316	322	215	227	251	251	333	333	264	264
27	SDOGO_24	-16,067722	-50,176722	163	163	284	300	?	?	204	234	322	324	221	227	251	251	333	333	264	264
28	SDOGO_25	-16,06775	-50,176694	163	163	280	300	156	156	204	238	316	322	215	227	251	251	333	333	264	264
29	SDOGO_26	-16,06775	-50,177083	163	163	280	300	?	?	204	238	316	322	213	227	251	259	329	333	264	264
30	SDOGO_27	-16,067833	-50,177056	163	163	300	300	166	166	204	234	322	326	221	247	251	259	329	333	264	264

Nº indivíduo	Indivíduo	Latitude	Longitude	SadH1		SadH5		SadH7		SadH9		SadH11		SadH13		SadH14		SadH16		SadH18	
31	SDOGO_28	-16,067833	-50,177083	163	171	280	280	156	156	204	226	316	322	219	243	251	251	333	333	260	264
32	SDOGO_29	-16,067861	-50,178028	163	163	280	280	158	158	204	204	320	324	219	243	251	251	329	333	260	260
33	SDOGO_30	-16,067917	-50,178	163	163	280	288	162	162	204	238	314	316	215	215	257	257	329	329	260	264
34	SDOGO_31	-16,067944	-50,178	163	163	280	288	162	162	204	238	314	316	215	215	257	257	329	329	260	264
35	SDOGO_32	-16,067944	-50,178028	163	163	280	288	162	162	204	238	314	316	215	215	257	257	329	329	260	264
36	SDOGO_33	-16,067917	-50,178111	163	163	280	300	162	162	204	240	322	326	221	227	245	245	329	333	260	260
37	SDOGO_34	-16,068028	-50,178139	163	163	280	280	164	164	204	238	316	320	215	215	251	251	329	333	264	264
38	SDOGO_35	-16,068056	-50,178111	163	163	280	300	162	162	204	240	322	326	221	227	245	245	329	333	260	260
39	SDOGO_36	-16,068083	-50,178194	163	163	280	280	148	158	204	238	314	316	227	243	251	251	329	333	260	260
40	SDOGO_37	-16,068056	-50,178194	163	163	280	284	156	156	204	240	316	316	215	215	251	251	333	333	264	264
41	SDOGO_39	-16,068083	-50,17825	163	163	284	296	156	158	204	232	314	322	215	221	245	251	333	333	260	264
42	SDOGO_40	-16,069028	-50,18075	163	163	280	296	158	158	236	244	306	320	215	227	261	261	329	329	260	260
43	SDOGO_41	-16,069194	-50,180722	163	163	280	280	158	158	204	208	318	320	215	221	245	261	329	329	260	264
44	SDOGO_42	-16,069333	-50,180694	163	163	284	286	158	158	202	238	316	316	215	243	251	251	329	333	260	264
45	SDOGO_43	-16,069361	-50,180667	163	163	284	286	158	158	206	234	316	322	213	215	251	251	333	333	260	264
46	SDOGO_44	-16,069389	-50,180694	163	163	284	300	158	158	204	234	322	324	213	247	245	251	329	333	264	264
47	SDOGO_45	-16,069361	-50,180722	163	163	280	296	156	156	204	204	322	324	219	227	245	251	329	329	260	264
48	SDOGO_46	-16,069361	-50,180528	163	163	280	300	158	158	204	238	322	322	209	221	245	251	329	329	260	264
49	SDOGO_47	-16,069389	-50,180611	163	163	280	300	156	156	198	202	314	322	221	227	259	259	329	333	264	264
50	SDOGO_48	-16,069417	-50,180639	163	171	280	286	148	148	236	238	322	322	221	227	251	257	329	333	260	264
51	SDOGO_49	-16,069528	-50,180639	163	163	280	280	164	164	198	204	316	322	215	215	251	251	329	333	260	264
52	SDOGO_50	-16,0695	-50,180472	163	163	280	280	162	162	204	240	316	322	215	215	251	259	329	333	260	264
53	SDOGO_51	-16,069528	-50,180444	163	163	280	296	156	158	236	236	306	322	219	221	251	251	329	333	260	260
54	SDOGO_52	-16,069444	-50,180444	163	163	280	280	162	162	204	240	316	322	215	215	251	259	329	333	260	264
55	SDOGO_53	-16,069472	-50,180389	163	163	280	284	156	158	204	204	314	324	215	227	245	259	329	333	260	264
56	SDOGO_54	-16,069472	-50,180361	163	171	280	284	156	156	204	234	322	322	215	215	259	259	329	333	260	260
57	SDOGO_55	-16,069528	-50,180361	163	171	280	300	156	156	202	206	316	326	227	227	251	259	329	333	260	264
58	SDOGO_57	-16,069639	-50,180306	163	163	280	280	162	162	202	228	314	316	217	229	251	251	329	333	260	264
59	SDOGO_58	-16,069583	-50,180361	163	163	280	290	162	162	204	234	316	326	215	215	245	251	329	333	260	260
60	SDOGO_59	-16,069556	-50,18025	163	163	280	280	160	162	198	204	306	324	217	233	251	251	329	329	264	264

Nº indivíduo	Indivíduo	Latitude	Longitude	SadH1		SadH5		SadH7		SadH9		SadH11		SadH13		SadH14		SadH16		SadH18	
60	SDOGO_59	-16,069556	-50,18025	163	163	280	280	160	162	198	204	306	324	217	233	251	251	329	329	264	264
61	SDOGO_60	-16,069556	-50,180194	163	163	286	296	162	162	204	242	316	320	229	229	259	261	329	329	260	260
62	SDOGO_61	-16,069611	-50,180111	163	163	286	300	162	162	204	242	316	320	209	217	261	261	329	329	260	260
63	SDOGO_62	-16,0695	-50,180111	163	163	284	300	156	156	236	242	314	316	215	215	259	261	329	333	?	?
64	SDOGO_65	-16,069528	-50,179833	163	163	284	286	158	162	204	244	324	326	?	?	251	261	329	333	264	264
65	SDOGO_66	-16,0695	-50,179833	163	163	296	296	156	158	238	240	314	316	217	221	245	251	329	333	260	264
66	SDOGO_68	-16,069083	-50,181167	163	163	288	300	148	158	204	238	316	326	215	233	251	261	333	333	264	264
67	SDOGO_69	-16,069056	-50,181111	163	163	280	296	162	162	234	244	326	326	221	221	257	261	333	333	264	264
68	SDOGO_70	-16,069028	-50,181194	163	163	296	300	162	162	204	236	320	326	215	233	251	251	329	329	260	264
69	SDOGO_71	-16,068972	-50,181194	163	163	280	280	162	162	236	238	316	320	215	233	251	261	329	333	260	264
70	SDOGO_72	-16,068944	-50,181167	163	163	280	290	156	162	204	204	316	316	209	217	245	251	329	333	264	264
71	SDOGO_73	-16,068944	-50,181139	163	163	280	300	162	162	204	236	316	316	215	215	251	261	329	333	260	260
72	SDOGO_74	-16,068944	-50,181111	163	163	280	280	156	158	236	238	320	326	215	219	251	261	329	333	260	264
73	SDOGO_75	-16,068972	-50,181111	163	163	280	280	156	158	204	204	306	316	219	221	259	261	329	329	264	264
74	SDOGO_76	-16,069083	-50,181083	163	163	280	296	148	158	234	244	326	326	221	221	257	261	333	333	264	264
75	SDOGO_77	-16,069111	-50,181056	163	163	284	286	158	158	204	236	314	314	215	215	245	245	333	333	264	264
76	SDOGO_78	-16,069194	-50,18125	163	163	280	296	162	162	214	236	314	320	215	233	251	261	329	329	260	260
77	SDOGO_79	-16,069222	-50,181306	163	163	280	300	162	162	236	236	324	326	215	219	251	261	329	329	260	264
78	SDOGO_80	-16,069194	-50,181361	163	163	280	300	156	156	236	238	316	322	215	219	251	261	329	329	260	264
79	SDOGO_81	-16,072583	-50,184444	163	163	296	300	156	156	204	236	322	322	219	243	251	261	329	333	260	264
80	SDOGO_82	-16,072528	-50,184444	163	163	284	296	158	162	204	204	306	322	219	221	245	251	329	333	260	264
81	SDOGO_84	-16,072639	-50,184611	163	163	296	296	162	162	204	238	324	326	215	215	251	259	329	333	264	264
82	SDOGO_85	-16,072667	-50,184694	163	163	296	300	156	158	204	204	306	322	215	215	251	261	333	333	264	264
83	SDOGO_86	-16,07275	-50,184694	163	163	280	280	156	158	204	242	306	326	209	215	251	261	329	329	260	260
84	SDOGO_87	-16,072778	-50,184722	163	163	280	280	156	158	204	242	306	326	209	215	251	261	329	329	260	260
85	SDOGO_88	-16,072806	-50,184778	163	163	280	280	158	162	204	242	306	326	209	215	251	261	329	329	260	260
86	SDOGO_89	-16,073417	-50,185278	163	163	280	280	158	162	234	240	316	322	215	215	245	261	333	333	260	264
87	SDOGO_90	-16,073472	-50,185444	163	163	280	300	158	162	204	216	306	316	221	247	251	251	333	333	260	264
88	SDOGO_91	-16,073444	-50,185444	163	163	280	300	158	162	204	216	306	316	221	247	251	251	333	333	260	264
89	SDOGO_92	-16,07375	-50,185417	163	163	280	300	156	162	204	238	316	316	215	243	251	251	329	333	260	260
90	SDOGO_93	-16,074306	-50,185972	163	163	280	280	156	156	204	204	314	326	215	215	247	247	329	333	264	264

Nº indivíduo	Indivíduo	Latitude	Longitude	SadH1		SadH5		SadH7		SadH9		SadH11		SadH13		SadH14		SadH16		SadH18	
91	SDOGO_94	-16,074389	-50,186028	163	163	280	300	158	158	216	238	316	326	215	215	251	261	329	333	264	264
92	SDOGO_95	-16,074528	-50,185944	163	163	280	280	148	156	204	204	316	324	209	219	245	261	329	333	260	264
93	SDOGO_96	-16,074806	-50,186278	163	171	280	300	156	156	204	238	322	326	219	221	245	259	329	329	260	260
94	SDOGO_97	-16,074861	-50,186278	163	163	280	280	156	158	202	202	322	322	215	233	251	261	329	333	260	264
95	SDOGO_98	-16,074889	-50,186278	163	163	280	280	156	158	198	204	306	322	215	233	251	251	329	333	264	264
96	SDOGO_99	-16,075111	-50,186472	163	163	296	300	154	156	204	226	324	326	215	227	251	261	329	333	260	264
97	SDOGO_100	-16,075056	-50,186778	163	163	278	288	162	162	204	206	316	322	215	221	259	261	329	329	264	264
98	SDOGO_101	-16,074417	-50,187361	163	163	278	300	156	158	204	214	316	322	?	?	251	251	329	333	260	260
99	SDOGO_102	-16,074472	-50,187361	163	163	278	300	156	156	204	214	316	322	221	221	251	251	329	331	260	260
100	SDOGO_103	-16,074861	-50,187722	163	163	278	294	148	162	204	204	314	322	221	221	251	261	333	333	260	264
101	SDOGO_104	-16,074833	-50,187806	163	171	278	278	162	162	236	244	314	322	215	215	251	251	329	333	264	266
102	SDOGO_105	-16,07475	-50,18775	163	163	278	296	156	158	204	204	322	322	233	233	259	261	329	329	260	264
103	SDOGO_106	-16,075056	-50,187972	163	171	278	296	158	158	204	236	320	322	209	209	251	251	333	333	260	264
104	SDOGO_107	-16,075	-50,187972	163	163	278	300	158	162	204	204	314	322	221	233	245	245	329	333	260	264
105	SDOGO_108	-16,075	-50,188028	163	163	280	300	162	162	198	202	306	322	215	233	251	259	329	333	264	264
106	SDOGO_109	-16,075028	-50,188056	163	163	286	300	156	156	202	214	306	322	209	233	245	251	333	333	260	264
107	SDOGO_110	-16,074972	-50,188083	163	163	280	300	162	162	204	204	322	322	215	221	251	259	329	333	264	264
108	SDOGO_111	-16,074944	-50,188056	163	163	280	284	148	158	204	238	306	306	215	219	259	259	329	329	260	260
109	SDOGO_112	-16,074944	-50,188111	163	163	284	286	156	156	204	204	306	320	219	243	251	251	329	333	260	264
110	SDOGO_114	-16,075	-50,188139	163	163	280	280	162	162	204	204	322	326	221	221	251	259	329	329	260	264
111	SDOGO_115	-16,074972	-50,188194	163	163	280	300	162	162	204	204	316	316	215	219	251	259	329	329	264	264
112	SDOGO_116	-16,074972	-50,188222	163	163	278	300	156	156	236	242	306	324	215	221	251	261	329	333	260	264
113	SDOGO_117	-16,075056	-50,188222	163	163	280	286	156	156	204	236	316	322	217	217	245	251	329	333	260	264
114	SDOGO_118	-16,075028	-50,18825	163	163	280	300	158	162	204	214	306	324	217	221	251	251	329	333	260	260
115	SDOGO_121	-16,075278	-50,18825	163	163	280	280	156	156	204	228	326	326	221	221	251	261	329	329	260	260
116	SDOGO_122	-16,075278	-50,188278	163	163	280	280	156	156	204	228	326	326	221	221	251	261	329	329	260	260
117	SDOGO_123	-16,07525	-50,188278	163	163	280	280	156	156	204	228	326	326	221	221	251	261	329	329	260	260
118	SDOGO_124	-16,075222	-50,188278	163	163	296	300	156	156	204	204	306	316	215	215	245	261	329	333	260	260
119	SDOGO_128	-16,075583	-50,188222	163	163	286	296	156	162	204	234	326	330	217	221	251	259	329	333	260	260
120	SDOGO_129	-16,075667	-50,188333	163	163	280	296	148	156	204	204	316	324	217	217	245	251	329	329	264	264

Nº indivíduo	Indivíduo	Latitude	Longitude	SadH1		SadH5		SadH7		SadH9		SadH11		SadH13		SadH14		SadH16		SadH18	
121	SDOGO_131	-16,075444	-50,188694	163	163	280	284	156	156	204	242	314	330	215	219	251	251	333	333	260	260
122	SDOGO_133	-16,075583	-50,188806	163	171	282	286	156	158	204	204	314	322	217	229	251	261	329	329	260	260
123	SDOGO_134	-16,0755	-50,188889	163	163	280	296	162	162	204	204	316	322	217	245	251	261	329	329	260	264
124	SDOGO_136	-16,075861	-50,188889	163	163	280	280	158	162	204	210	320	322	215	215	259	261	329	333	260	260