

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO**

Jacqueline de Souza Lima

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA ESPACIAL  
INTRAPOPULACIONAL EM *Tibouchina papyrus* (POHL)  
TOLEDO UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSSATÉLITES**

Orientador (a): Mariana Pires de Campos Telles

GOIÂNIA - GO  
FEVEREIRO – 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO**

Jacqueline de Souza Lima

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA ESPACIAL**  
**INTRAPOPULACIONAL EM *Tibouchina papyrus* (POHL)**  
**TOLEDO UTILIZANDO MARCADORES**  
**MICROSSATÉLITES**

Orientador (a): Mariana Pires de Campos Telles

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Mariana Pires de Campos Telles

GOIÂNIA - GO  
FEVEREIRO – 2011

JACQUELINE DE SOUZA LIMA

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA ESPACIAL  
INTRAPOPOPULACIONAL EM *Tibouchina papyrus* (POHL)  
TOLEDO UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução para obtenção do título de Mestre.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2011.

Rosane Garcia Collevatti

Bianca Waléria Bertoni

Mariana Pires de Campos Telles  
(Orientadora)

## DEDICATÓRIA

*Ao meu querido pai, Edinor,*

*OFEREÇO*

*À minha amada mãe, Cleide Maria,*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTO

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa dissertação. Em especial:

À minha orientadora e amiga, Professora Doutora Mariana Pires de Campos Telles, pela companhia nas coletas, pelos ricos ensinamentos, por acompanhar cada etapa dessa dissertação, por incentivar o meu crescimento profissional, mas principalmente por sempre ter acreditado em mim.

Às pessoas que mais amo, minha família: meus pais queridos Edinor e Cleide Maria, pelo apoio sincero e amor incondicional. E ao meu irmão amado, Felipe.

Ao meu companheiro de todas as horas, Magno Marinho, pela paciência e companheirismo. Obrigada por sempre estar ao meu lado, independente das minhas decisões.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Genética & Biodiversidade, pessoas queridas com quem eu passo a maior parte do dia, obrigada por me aguentarem e por fazerem meus dias de trabalho mais divertidos.

Aos professores do Laboratório de Genética & Biodiversidade, pelos ensinamentos, especialmente a Professora Doutora Rosane Garcia Collevatti, por me conduzir nas análises de dados.

Aos amigos e Biólogos Advaldo Carlos de Souza Neto e Thiago Bernardi pela ajuda na formatação, análises e na confecção do mapa.

À amiga e Bióloga Franciele Parreira Peixoto, que muito ajudou com o seu trabalho monográfico.

Ao amigo e Biólogo Felipe Gouveia pela divertida companhia e pelas várias caronas.

À Mestre e amiga Monik Oprea por me acompanhar nesses dois anos de mestrado, me ajudando nas disciplinas e pelas sugestões e correções nesse trabalho.

À Capes, CNPq e à empresa Systema Naturae de Consultoria Ambiental LTDA, pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização dessa dissertação.

Enfim, o meu muito OBRIGADA!

## RESUMO

*Tibouchina papyrus* é uma Melastomataceae endêmica do Cerrado que possui distribuição disjunta e restrita aos campos rupestres, com essas características peculiares ela pode ser considerada modelo de espécie, auxiliando em estudos de outras plantas do Cerrado que exibem o mesmo conjunto de características. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a variabilidade genética existente em regiões microssatélites do genoma de *T. papyrus* e utilizar metodologias de análise estatística espacial para avaliar a diversidade e a estrutura genética nas três subpopulações disjuntas da espécie. Foram amostradas folhas e georreferenciados indivíduos nas Serras dos Pirineus (216) Serra Dourada (66) e Serra de Natividade (192). Para a obtenção dos genótipos foram utilizados dez locos microssatélites desenvolvidos para a espécie. Os dez locos produziram uma média de 3,4 alelos e foi detectado um grande número de alelos privados (19 no total) nas três subpopulações avaliadas. Foi observado valores de ( $f$ ) significativos em duas subpopulações, indicando que estas subpopulações não estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor global de  $\theta$  foi significativo e igual a 0,712, apresentando uma altíssima divergência genética entre as subpopulações. Sendo assim, as três subpopulações de *T. papyrus* podem ser tratadas como três diferentes ESUs. A estrutura genética espacial intrapopulacional apresentou-se fraca em duas subpopulações, com baixos níveis de  $S_p$ . A existência de autocorrelação espacial pouco intensa corrobora com a hipótese de que espécies com dispersão pelo vento não exiba esta estrutura, em função do fluxo gênico causado pela dispersão de sementes em longas distâncias. Isso é plausível para *T. papyrus*, que apresenta dispersão por anemocoria. Apesar da fraca EGE intrapopulacional encontrada em duas subpopulações, baseado nos correlogramas de parentesco, foram observados valores positivos e significativos nas primeiras classes de distância, indicando um maior grau de parentesco entre esses indivíduos. O intercepto do correlograma para cada uma das subpopulações pode indicar o distanciamento mínimo onde é mais provável amostrar indivíduos menos semelhantes, que é uma informação relevante para o manejo das subpopulações da espécie *T. papyrus*. Com base nos dados genéticos obtidos ficou evidente que as três subpopulações da espécie *T. papyrus* devem ser conservadas, pois cada uma contém uma quantidade de variabilidade genética única que não é compartilhada entre elas. Sendo assim, teoricamente torna-se possível a manutenção do potencial evolutivo da espécie e evita a extinção local nas três únicas regiões de ocorrência natural da espécie.

## ABSTRACT

*Tibouchina papyrus* is a Melastomataceae endemic to the Cerrado. It has a disjunct distribution, restricted to “campos rupestres”. Therefore, it can be considered a model species, helping guide Cerrado endemic plant studies. Thus, this study aimed to characterize genetic variability in microsatellite regions of *T. papyrus* genome and use spatial statistical analysis methods to assess genetic diversity and structure in disjunct populations. Individuals were georeferenced and leaf samples were taken from the localities of Serra dos Pirineus (216), Serra Dourada (66) and Serra de Natividade (192). In order to obtain the genotypes, we used ten microsatellite loci that were developed for *T. papyrus*. The locus showed a mean of 3,4 alleles and a large number of private alleles was detected (19 in total) at the populations studied. Values ( $f$ ) significant were observed for two populations, indicating that populations not are following the proportions expected by Hardy-Weinberg. The global  $\theta$  value is significant and equal to 0.712, showing a high differentiation among the three populations studied. Thus, the three populations of *T. papyrus* can be treated as three different ESUs. Spatial genetic structure was weak for two populations, with low levels of  $S_P$ . The low SGS corroborates the hypothesis that wind-dispersed species present no SGS due to long distance gene flow because of seed dispersal. This is plausible for *T. papyrus*, which is a wind-dispersed species. Despite the low intra-population SGS found in two populations, based on the relationship between kinship and distance, significant positive values were observed for the some distance class, indicating higher values for the relationship between these individuals. The intercept of the correlogram for each population may indicate the minimum distance where it is more likely that sampled individuals are less similar, which is an information applicable for the management of *T. papyrus* populations. Based on genetic data, it was evident that the three *T. papyrus* populations must be preserved, because each one contains a number of unique genetic variability that is not shared between them. Thus, theoretically it is possible to maintain the evolutionary potential of this species and to avoid local extinction in only three regions where it occurs.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bioma e espécie de estudo.....	1
1.2. Diversidade e estrutura genética.....	4
1.3. Estrutura genética espacial.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo geral.....	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. HIPÓTESES.....	9
4. METODOLOGIA.....	10
4.1. Coleta.....	10
4.2. Obtenção de dados genéticos.....	13
4.3. Análise estatística.....	14
4.3.1. Caracterização da variabilidade genética.....	14
4.3.2. Estrutura genética entre subpopulações.....	16
4.3.3. Estrutura genética espacial intrapopulacional.....	17
4.3.4. Programas utilizados.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Caracterização da variabilidade genética.....	19
5.2. Estrutura genética entre subpopulações.....	25
5.3. Estrutura genética espacial intrapopulacional.....	38
6. DISCUSSÃO.....	32
6.1. Variabilidade e estrutura genética.....	32
6.2. Estrutura genética espacial intrapopulacional.....	36
7. CONCLUSÃO.....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
9. APÊNDICES.....	52



## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> <i>Tibouchina papyrus</i> na Serra Dourada; À direita detalhe do tronco demonstrando as lascas com aspecto de papel.....	2
<b>Figura 2.</b> Mapa de ocorrência registrada para espécie <i>Tibouchina papyrus</i> . Obtido: ArcGis 9.2 (ESRI, 2006).....	3
<b>Figura 3.</b> Distribuição espacial dos indivíduos de <i>Tibouchina papyrus</i> amostrados na subpopulação de Serra dos Pirineus.....	11
<b>Figura 4.</b> Distribuição espacial dos indivíduos de <i>Tibouchina papyrus</i> amostrados na subpopulação de Serra Dourada.....	12
<b>Figura 5.</b> Distribuição espacial dos indivíduos de <i>Tibouchina papyrus</i> amostrados na subpopulação de Serra de Natividade.....	12
<b>Figura 6.</b> Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap4 (a, b, c) e Tpap5 (d, e, f) nas três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> .....	20
<b>Figura 7.</b> Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap6 (a, b, c) e Tpap8 (d, e, f) nas três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> .....	21
<b>Figura 8.</b> Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap12 (a, b, c) e Tpap15 (d, e, f) nas três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> .....	22
<b>Figura 9.</b> Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap16 (a, b, c) e Tpap17 (d, e, f) nas três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> .....	23
<b>Figura 10.</b> Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap18 (a, b, c) e Tpap19 (d, e, f) nas três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> .....	24
<b>Figura 11.</b> Comparação entre os valores globais estimados para $R_{ST}$ e $\theta$ pela análise das médias e erro padrão.....	27
<b>Figura 12.</b> Distribuição das distâncias par a par entre indivíduos das três subpopulações de <i>T. papyrus</i> (Teste Kolmogorov-Smirnov $p < 0,001$ ).....	28
<b>Figura 13.</b> Correlograma entre coeficiente de parentesco e classe de distância de indivíduos da Serra dos Pirineus. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%; 10.000 permutações).....	30
<b>Figura 14.</b> Correlograma entre coeficiente de parentesco e classe de distância de indivíduos da Serra de Dourada. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%; 10.000 permutações).....	30
<b>Figura 15.</b> Correlograma entre coeficiente de parentesco e classe de distância de indivíduos da Serra de Natividade. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%; 10.000 permutações).....	31

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Caracterização das três subpopulações amostradas de <i>Tibouchina papyrus</i> .	10
<b>Tabela 2.</b> Relação dos pares de iniciadores de regiões microssatélites utilizados e suas características.....	13
<b>Tabela 3.</b> Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	14
<b>Tabela 4.</b> Classes de distância utilizadas para análises de estrutura genética espacial intrapopulacional das três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> .....	18
<b>Tabela 5.</b> Relação dos locos com seus respectivos números de indivíduos analisados (N), heterozigosidade esperada (He), observada (Ho), probabilidade de identidade (I) e probabilidade de exclusão de paternidade (Q).....	19
<b>Tabela 6.</b> Relação dos locos que apresentaram alelos privados, com os respectivos alelos privados, a subpopulação na qual o alelo está presente e sua frequência alélica.....	25
<b>Tabela 7.</b> Variabilidade genética nas três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> , baseada em dez marcadores microssatélites. (N) número de indivíduos; (A) número médio de alelos; heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e índice de fixação ( <i>f</i> ).....	26
<b>Tabela 8.</b> Análise de variância das frequências alélicas e análise de variância do tamanho dos alelos para os locos microssatélites em três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> .....	26
<b>Tabela 9.</b> Divergência genética ( $\theta$ ) entre as três subpopulações de <i>Tibouchina papyrus</i> .....	27
<b>Tabela 10.</b> Comparação da estrutura genética espacial intrapopulacional e vizinhança genética entre as três subpopulações. $F_I$ – valor de $F_{ij}$ (intra grupo); $b$ – inclinação da regressão; $S_p$ – parâmetro de força da estrutura genética espacial; $N_b$ – vizinhança genética.....	31

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Bioma e espécie de estudo*

O Cerrado é o segundo maior bioma do país, ocupando originalmente cerca de 23% do território brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia (Klink & Machado, 2005; Marinho-Filho *et al.*, 2010). Ocorre predominantemente em regiões de clima estacional, solos ácidos e pobres em nutrientes, caracterizando-se por apresentar fisionomias variáveis: campo limpo, campo sujo, campo rupestre, cerrado *sensu stricto* e cerradão (Ribeiro *et al.*, 2008; Alves & Kolbek, 2010). Ao lado da Mata Atlântica, é um dos biomas mais alterados do país, nos últimos 35 anos, mais da metade dos 2 milhões de km<sup>2</sup> do Cerrado tem sido transformado em pastagem e cultivos para agricultura (Klink & Machado, 2005). Este bioma possui uma flora com um índice de endemismo muito alto, com 40% de flora endêmica, sendo, portanto, considerado a savana tropical mais rica do mundo (Ratter *et al.*, 2003). Devido à grande quantidade de cobertura vegetal original do Cerrado que está sendo perdida, existe uma urgência em implementar planos viáveis para a definição de áreas de conservação no sentido de preservar a biodiversidade deste bioma (Diniz-Filho *et al.*, 2007).

Árvores tropicais são especialmente vulneráveis aos efeitos de degradação do habitat, devido às suas características demográfica e reprodutiva, incluindo baixa densidade de ocorrência, sistemas de acasalamento complexos, altas taxas de fecundação cruzada (Cascente *et al.*, 2002) e interações com polinizadores e dispersores de sementes (Ward *et al.* 2005).

*Tibouchina papyrus* (Figura 1) é uma espécie de árvore pertencente à família Melastomataceae que tem importância ecológica, ornamental e cultural, sendo considerada uma das árvores símbolo do Estado de Goiás. Recebe o nome popular “pau-papel”, por apresentar córtex perfeitamente branco, composto de camadas separáveis e bastante delgadas, tendo consistência de papel da China. É uma árvore hermafrodita de aproximadamente 3 metros que ocorre em alturas elevadas acima de 900 metros (Teixeira, 1969; Rizzo, 1981; Montoro & Santos, 2007; Ribeiro & Walter, 2008). Possui distribuição agregada, ou seja, quando analisamos a distribuição espacial de seus indivíduos ao longo de uma paisagem verificamos que em alguns lugares têm muito mais indivíduos e outros têm muito menos, ou nenhum (Brown & Lomolino, 2006).



**Figura 1.** *Tibouchina papyrus* na Serra Dourada; À direita detalhe do tronco demonstrando as lascas com aspecto de papel.

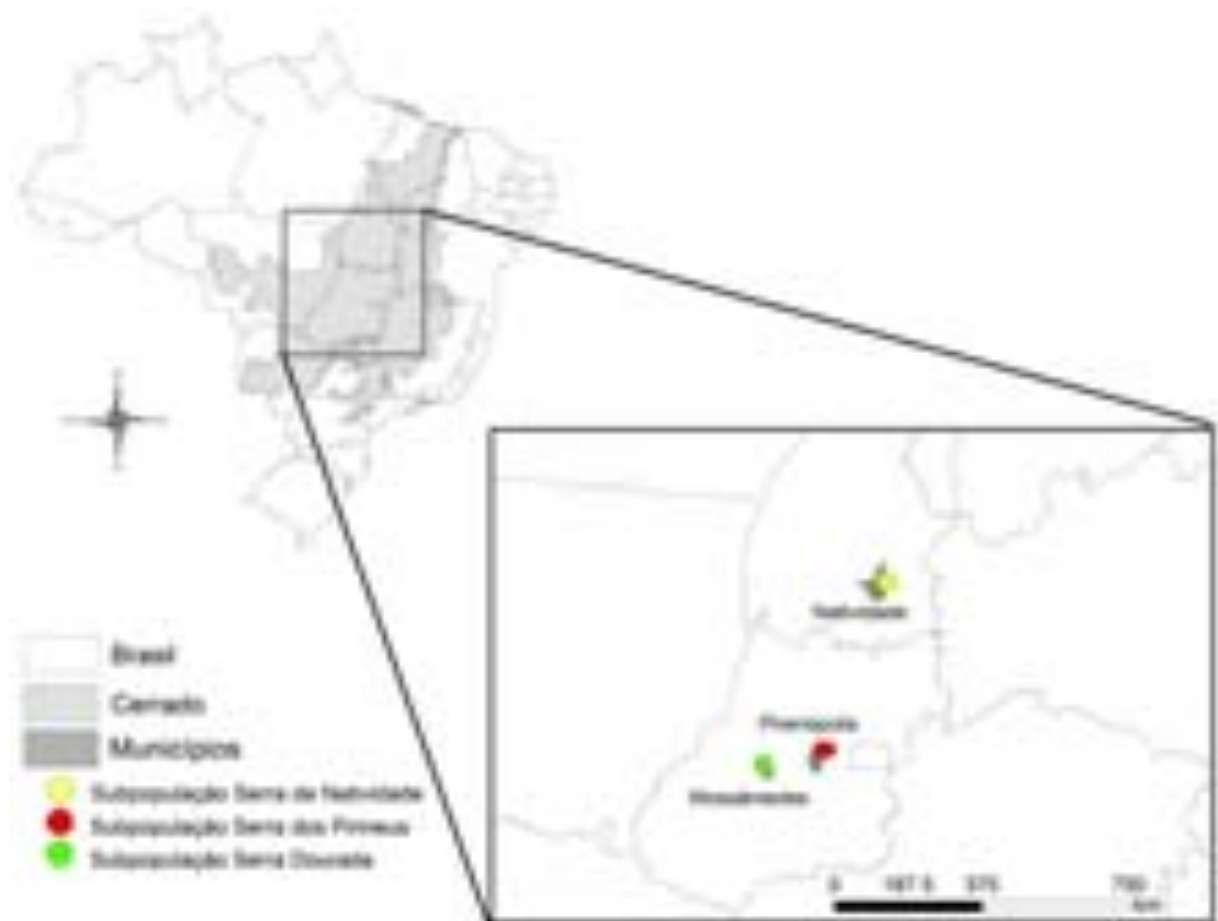
Segundo Montoro & Santos (2007), a espécie possui fruto tipo cápsula e as sementes são muito pequenas, com dispersão anemocórica que ocorre em época de altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar, que favorecem o dessecamento e a deiscência do fruto, sendo que o amadurecimento dos frutos acontece no período de abril a outubro.

As flores de *T. papyrus* são polinizadas por espécies de abelhas pertencentes ao gênero *Bombus sp.*, popularmente conhecida como mamangavas, sendo a presença desses visitantes observada somente durante o dia. Devido à natureza assincrônica da floração de *T. papyrus*, o visitante floral necessita visitar vários indivíduos, promovendo assim a polinização cruzada (Montoro & Santos, 2007).

A espécie *Tibouchina papyrus* apresenta endemismo aos campos rupestres do bioma Cerrado, região que apresenta uma das mais altas taxas de endemismo vegetal, com vegetação composta por sub-arbustos e arbustos (Montoro & Santos, 2007; Ribeiro & Walter, 2008). Até o momento, sua ocorrência foi registrada somente em Serra dos Pireneus – Pirenópolis – Goiás, Serra Dourada no município de Mossâmedes - Goiás e em Serra de Natividade no

município de Natividade – Tocantins (Pohl, 1951; Teixeira, 1969; Rizzo, 1981; Montoro & Santos, 2007; Ribeiro & Walter, 2008) (Figura 2).

Em decorrência de sua distribuição restrita, esta espécie foi enquadrada pelo critério D2 da IUCN (2001) como vulnerável, na revisão da lista de espécies de flora ameaçada do Brasil proposta pela Fundação Biodiversitas (2005) e publicada pelo Ministério do Meio Ambiente (Instrução Normativa nº 6/08), critério utilizado para espécies com populações muito pequenas, tipicamente menos que 20 km<sup>2</sup>, ou com ocorrência em poucas localidades, que dessa forma estão sujeitas a eventos estocásticos e, portanto capazes de se tornar Criticamente em Perigo ou até Extinta (IUCN, 2001).



**Figura 2.** Mapa de ocorrência registrada para espécie *Tibouchina papyrus*. Obtido: ArcGis 9.2 (ESRI, 2006).

## 1.2 *Diversidade e estrutura genética*

Conhecer os padrões de distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações naturais é fundamental para adotar estratégias conservacionistas efetivas e eficientes (DeSalle & Amato, 2004; Frankham, 2010). De acordo com Loveless & Hamrick (1984), para tomar decisões fundamentadas sobre procedimentos de preservação e amostragem, os pesquisadores devem entender como a variabilidade genética é distribuída ao longo de uma espécie.

A diversidade genética pode assegurar às populações um alto potencial adaptativo e evolutivo para contrapor os efeitos gerados pelas estocasticidades ambientais (Geburek & Konrad, 2008), sendo medida pela heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) (Nei, 1972; Nei, 1978), além disso, pode ser caracterizada pela porcentagem de locos polimórficos ( $P$ ), número médio de alelos por loco ( $A$ ) e heterozigosidade observada ( $H_o$ ).

O estudo da variabilidade genética das espécies endêmicas do Cerrado, como *Tibouchina papyrus*, é de suma importância para avaliar a probabilidade de persistência dessas espécies nos remanescentes de Cerrado. Pequenas populações estão sujeitas a um rápido declínio em número e à extinção local, devido a três principais razões: perda da variabilidade genética, causada principalmente por endogamia e/ou deriva genética, variações nas taxas de nascimento e mortalidade (flutuações demográficas) e flutuações ambientais de toda ordem (Primack & Rodrigues, 2001; Frankham *et al.*, 2008). Um aspecto favorável para estudar a diversidade genética usando marcadores microssatélites é que em geral, um grande número de alelos é detectado (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Oliveira, 2006).

A estrutura genética refere-se a distribuição de alelos e genótipos. Ela pode se manifestar entre populações geograficamente distintas e assim como a diversidade genética, é influenciada por fatores como o modo de reprodução, distribuição espacial dos indivíduos e fatores evolutivos (Loveless & Hamrick, 1984).

A medida clássica para avaliar a estrutura genética de uma população é baseada nas estatísticas-F de Wright (1951) (Holsinger & Weir, 2009), que permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ), assim como dos níveis de endogamia ao nível populacional ( $F_{IS}$ ) e total ( $F_{IT}$ ) (Wright, 1951; Holsinger & Weir, 2009). Neste sentido, a estrutura genética da população refere-se à heterogeneidade na distribuição dos alelos nos genótipos entre as populações (Robinson, 1998; Diniz-Filho & Telles, 2002).

O fluxo gênico pode ser quantificado indiretamente a partir da análise da estrutura genética das populações utilizando o valor de  $F_{ST}$ , sendo assim considerado como uma estimativa de fluxo gênico, pois assume que a estrutura genética da população se segue um modelo de fluxo gênico em ilhas (Wright, 1943), ou seja, onde há um equilíbrio entre migração e deriva genética. Partindo deste pressuposto,  $F_{ST}$  é uma função do número de migrantes por geração,  $Nm$ , onde  $N$  é o tamanho da população e  $m$  é a taxa de migrantes por geração (Cockerhan & Weir, 1993).

Padrões de variabilidade genética dentro da espécie são utilizados para definir unidades de conservação intraespecífica (Ryder, 1986; Avise & Hamrick, 1996; Newton *et al.*, 1999; Frankham *et al.*, 2008). Essas unidades são chamadas de unidades evolutivamente significantes (ESU), o conceito foi aplicado por Ryder em 1986, para fornecer uma base para a priorização para populações de espécies que apresentam atributos genéticos importantes para as gerações presentes e futuras. Isto proporcionou uma base para as discussões sobre unidades de conservação abaixo do nível de espécie (Guia & Saitoh, 2007).

Inicialmente, o conceito foi aplicado a populações com isolamento reprodutivo e histórico e com características adaptativas distintas de outras populações dentro da espécie (Ryder, 1986; Waples, 1991). Moritz (1994) propôs que se os genótipos do DNAmt revelam monofilia recíproca entre as populações e os locos nucleares mostram que existe divergência significativa nas frequências dos alelos, então elas devem ser definidas como ESUs separadas e manejadas separadamente. Segundo Crandall e colaboradores (2000) a ideia fundamental das ESU's é que a conservação deve ter como objetivo a preservação de processos evolutivos e potencial adaptativo, e não apenas das espécies.

### **1.3 Estrutura genética espacial**

A estrutura genética espacial (EGE) refere-se à distribuição espacial não aleatória dos genótipos de indivíduos dentro de uma população (Vekemans & Hardy, 2004). Diversos processos evolutivos e ecológicos, como a dispersão de sementes e pólen, competição inter e intra-específica e heterogeneidade do ambiente podem afetar os padrões de distribuição espacial dos indivíduos dentro de uma população (Loveless & Hamrick, 1984; Loiselle *et al.*, 1995; Oddou-Muratorio *et al.*, 2003).



Dispersão de sementes e pólen está entre os principais determinantes da estrutura genética em plantas. Sendo assim, o conhecimento desses parâmetros é relevante para o estabelecimento de gestão e orientações para conservação dessas espécies (Ndiade-Bouroubou *et al.*, 2010). Estimar diretamente a dispersão de sementes e pólen não é uma tarefa fácil e requer experimentação com esforço considerável. Assim, abordagens indiretas foram desenvolvidas para estimar o fluxo gênico, estas abordagens baseiam-se na verificação da EGE (Smouse *et al.*, 2001; Smouse & Sork, 2004; Burczyk & Koralewski, 2005; Hardy *et al.*, 2006).

A dispersão de sementes e pólen geralmente acontece em diferentes escalas espaciais e pode contribuir de maneiras distintas para o fluxo gênico dentro de uma população. Kalisz *et al.* (2001) apontaram quatro possíveis cenários, com diferentes características de dispersão: (i) Quando a dispersão de ambos, pólen e sementes é localizada, indivíduos mais próximos geograficamente serão mais aparentados e a população irá evoluir pelo modelo de fluxo gênico, isolamento por distância, descrito por Wright, 1946. (ii) Por outro lado, quando a dispersão de ambos, pólen e semente ocorre de forma ampla, dentro de uma população, não haverá EGE. (iii) Quando a dispersão do pólen é extremamente localizada, mas a semente é dispersa a longas distância, espera-se que não existirá endogamia e nem EGE (se não há autofecundação), e (iv) quando o pólen é muito disperso, mas a dispersão de sementes é extremamente localizada, não haverá endogamia, porém, espera-se encontrar agregações de indivíduos aparentados, que resultará em uma EGE significativa. Assim, a magnitude e escala de dispersão devem ser medidas para verificar sua influência no fluxo gênico e conseqüentemente na EGE.

Segundo Loveless & Hamrick (1984), diferentes padrões na dispersão de sementes têm efeitos nos níveis de variação genética dentro das populações e na distribuição da variação genética entre as populações. Em espécies que apresentam dispersão por anemocoria, o movimento das sementes depende da velocidade dos ventos e das características morfológicas das sementes. Este tipo de dispersão inibe a diferenciação local, mesmo com a migração sendo limitada.

Em abordagens intrapopulacionais, a EGE pode ser caracterizada pela relação entre estimativa de parentesco entre os pares de indivíduos e as distâncias físicas (geográficas) entre eles (Loiselle *et al.*, 1995; Rousset, 2000; Hardy, 2003a), auxiliando na detecção de indivíduos aparentados e permitindo inferir sobre o alcance do fluxo gênico e o tamanho do



grupo de vizinhança, informações que são importantes para a gestão de programas de conservação (Collevatti *et al.*, 2010).

A força da EGE pode ser medida como a taxa de diminuição da similaridade genética com a distância geográfica. Considera-se que uma variável apresenta autocorrelação espacial, quando os valores da variável de interesse observados em pares de locais distanciados entre si são mais similares (autocorrelação positiva) ou menos similares (autocorrelação negativa) do que o esperado para pares de observações associados ao acaso (Legendre, 1993).

As técnicas moleculares aliadas às técnicas de autocorrelação espacial possibilitaram o aprimoramento dos métodos de análise e permitiram a estimativa do fluxo gênico aparente dentro e entre populações, com base na EGE entre plantas (Epperson, 2003; Fenster *et al.*, 2003; Vekemans & Hardy, 2004; Diniz Filho *et al.*, 2008). Os marcadores microssatélites são eficientes para este tipo de análise, pois apresentam um padrão de herança co-dominantes e tem sido utilizados para responder questões acerca do tamanho efetivo da população, estrutura genética, taxa de migração, sistemas de acasalamento e conservação de recursos genéticos (Wright & Bentzen, 1994; Brondani *et al.*, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a variabilidade genética existente em regiões microssatélites do genoma de *Tibouchina papyrus* e avaliar a estrutura genética espacial nas subpopulações disjuntas de *Tibouchina papyrus* com ocorrência restrita ao cerrado rupestre.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Descrever a variabilidade genética existente nos indivíduos de cada uma das três áreas de ocorrência da espécie *Tibouchina papyrus*;
- Verificar se a variabilidade genética está estruturada entre e dentro das subpopulações;
- Estimar a divergência genética entre as três subpopulações;
- Estimar o fluxo gênico aparente entre as três subpopulações;
- Avaliar se existe padrão espacial na variabilidade genética intrapopulacional;
- Verificar se há formação de grupos de vizinhança do ponto de vista genético entre os indivíduos dentro de cada subpopulação.

### 3. HIPÓTESES

1. Considerando que as subpopulações de *Tibouchina papyrus* são grandes, a polinização é realizada por abelhas do gênero *Bombus sp* e a floração é assincrônica, espera-se uma elevada ocorrência de fecundação cruzada, portanto existe uma alta variabilidade genética para a espécie *T. papyrus*;
2. Devido ao fato da área de ocorrência da espécie *T. papyrus* ser restrita a somente três localidades disjuntas (Serra dos Pirineus, Serra Dourada e Serra de Natividade), elevados níveis de estruturação na variabilidade genética serão encontrados e conseqüentemente uma alta divergência genética entre as subpopulações; Sendo assim, é provável que não haja fluxo gênico atual entre essas subpopulações de *T. papyrus*;
3. Com base no padrão de dispersão de sementes anemocórico de *T. papyrus*, há uma estruturação genética espacial intrapopulacional fraca ou inexistente, já que este tipo de dispersão inibe a formação de grupos aparentados, mesmo com a migração sendo limitada.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Coleta

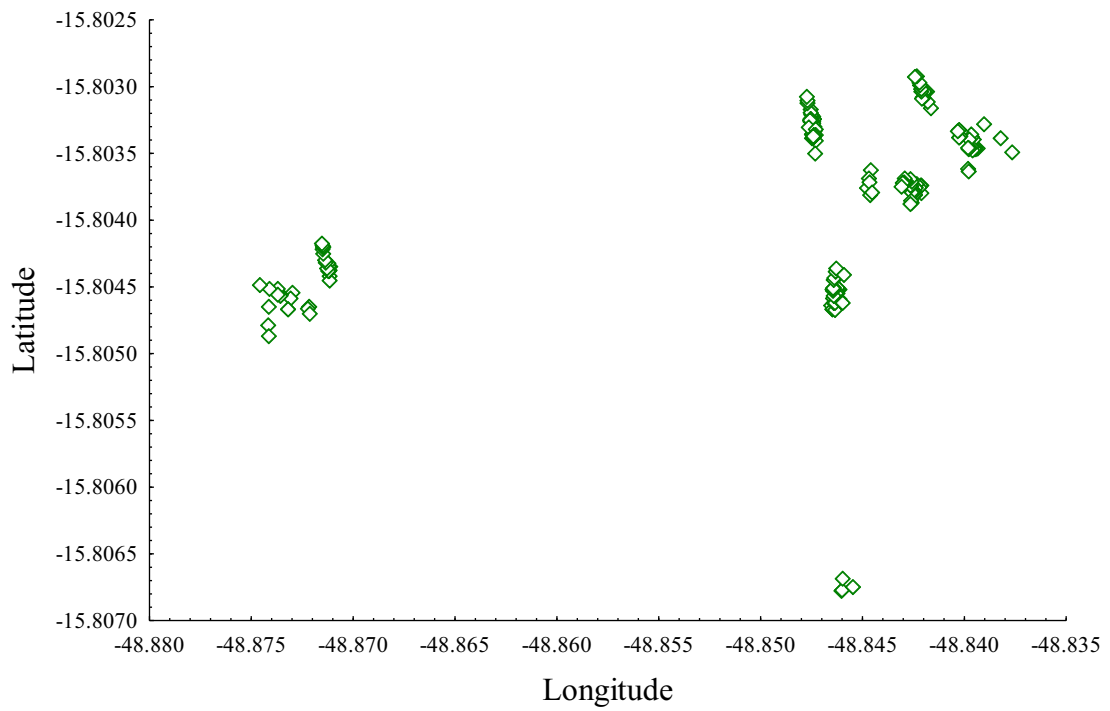
A coleta do material foi realizada nas áreas de ocorrência registradas para a espécie *Tibouchina papyrus*: Serra dos Pirineus e Serra Dourada, ambas localizadas no Estado de Goiás, e Serra de Natividade, que está localizada no Estado do Tocantins (Figura 2). Sobre os afloramentos rochosos, a cobertura das Serras é composta por campo rupestre, um tipo de vegetação complexa, rica em espécies, onde predominam as formações herbáceo-arbustivas, com solos rasos e pobres em nutrientes (Alves & Kolbek, 2010).

As duas subpopulações localizadas no Estado de Goiás estão presentes no Parque Estadual da Serra dos Pirineus (extensão de aproximadamente 28.333 hectares) e Parque Estadual da Serra Dourada (área aproximada de 30.000 hectares).

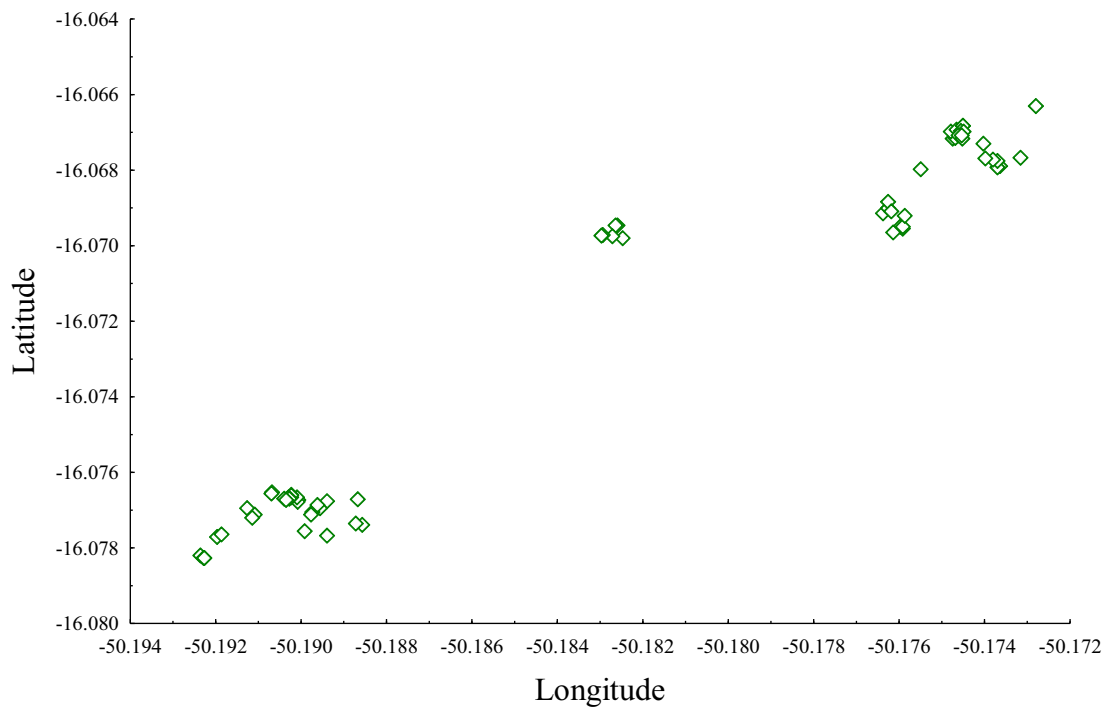
Nas subpopulações Serra dos Pirineus e Serra Dourada, tentou-se fazer uma representação máxima, amostrando folhas de todas as plantas que era possível a realização da coleta. Devido a grande quantidade de indivíduos da espécie na Serra de Natividade, cerca de 1.000 no total, nem todas as plantas observadas no local foram amostradas. Nessa subpopulação os indivíduos estão divididos em dois grupos, um localizado sob a Serra (560 m de altitude) e outro abaixo dela (300 m de altitude), assim, foram amostradas 96 plantas de cada grupo. Para todos os indivíduos amostrados foram determinadas as coordenadas geográficas pelo Sistema de Posicionamento Global – GPS (Figuras 3, 4, 5 e 6). No total foram coletadas folhas de 474 indivíduos (Tabela 1). As folhas coletadas foram depositadas em sacos de papel pardo, identificados com o número da planta e sua subpopulação de origem. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo, para o transporte até o laboratório.

**Tabela 1.** Caracterização das três subpopulações amostradas de *Tibouchina papyrus*.

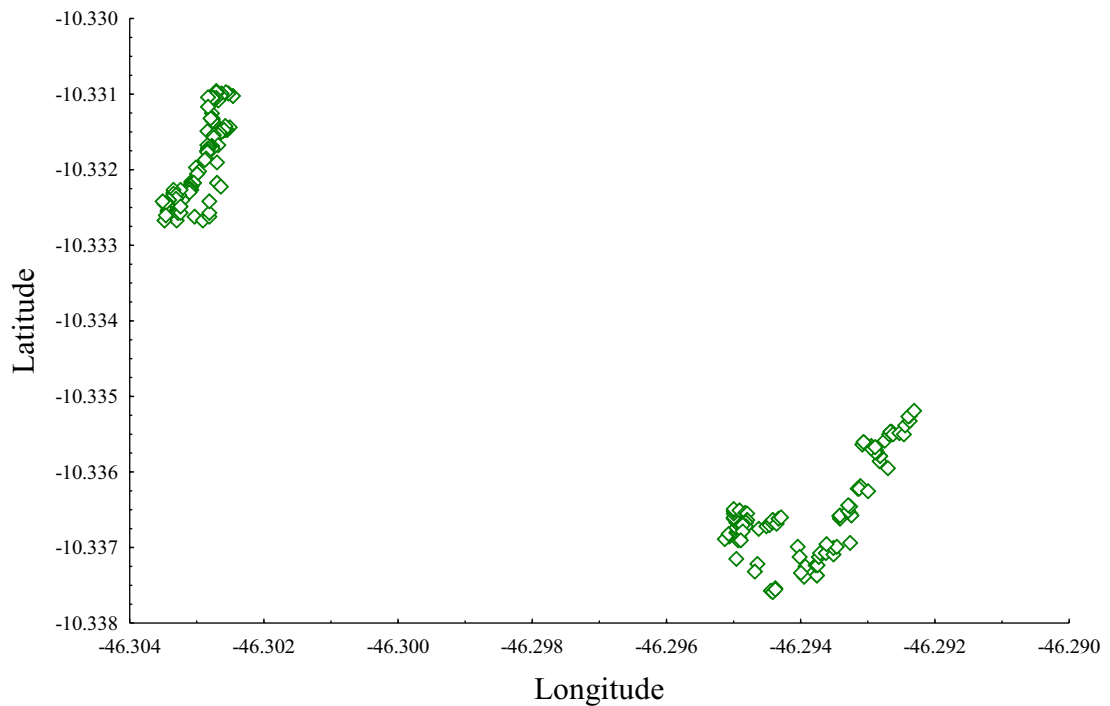
Localidade	Número de árvores amostradas	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)
Serra dos Pirineus	216	16° 03' 58"	50° 10' 22"	990
Serra Dourada	66	15° 47' 44"	48° 49' 57"	1010
Serra de Natividade	192	11° 40' 08"	47° 41' 51"	330 e 560
Total	474			



**Figura 3.** Distribuição espacial dos indivíduos de *Tibouchina papyrus* amostrados na subpopulação de Serra dos Pirineus.



**Figura 4.** Distribuição espacial dos indivíduos de *Tibouchina papyrus* amostrados na subpopulação de Serra Dourada.



**Figura 5.** Distribuição espacial dos indivíduos de *Tibouchina papyrus* amostrados na subpopulação de Serra de Natividade.

## 4.2 Obtenção dos dados genéticos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética & Biodiversidade, da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, GO. A extração do DNA total foi realizada a partir de tecido foliar, conforme o protocolo de extração de DNA proposto por Doyle & Doyle (1987) e descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998) (Apêndice 1). Após a extração, o DNA foi quantificado e diluído para a concentração de trabalho de aproximadamente  $2,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

Para a amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com o DNA de cada indivíduo, foram utilizados 10 pares de iniciadores para regiões microssatélites polimórficas, desenvolvidos para a espécie (Telles *et al.*, 2010) (Tabela 2). As reações foram realizadas a partir de um coquetel com volume final de  $15 \mu\text{L}$  (Tabela 3) e o programa de termociclagem foi utilizado com os seguintes passos: (1°) Desnaturação do DNA a  $94^\circ\text{C}$  por 5 minutos; (2°)  $94^\circ\text{C}$  por 1 minuto; (3°) temperatura específica de anelamento do iniciador por 1 minuto; (4°) Extensão da molécula pela enzima *Taq* DNA polimerase a  $72^\circ\text{C}$  por 1 minuto; (5°) 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passo; (6°) Passo final de extensão de 7 minutos a  $72^\circ\text{C}$  para finalizar os produtos amplificados.

**Tabela 2.** Relação dos pares de iniciadores de regiões microssatélites utilizados e suas características.

Loco	MR	Sensu	Anti-sensu	T <sub>a</sub>	AVA*
Tpap 4	(ATA) <sub>4</sub>	AATGTCAGTCGAAGGCTGGT	ATTTGCATGCTCATTGGTT	54	136/151
Tpap 5	(GTT) <sub>5</sub>	CGCTGCCTTCTTTACGATTC	CTAACCCACGCCAGATTT	58	348/351
Tpap 6	(TAA) <sub>4</sub>	CAAGCGCATAAACATAAACT	ACAAAACCAAGAAATTGCGG	56	137/143
Tpap 8	(CGG) <sub>6</sub>	TAGCGGGAGATCATTCCAAG	GGTAGGTGCAGAGCATGTGA	68	221/236
Tpap 12	(GA) <sub>6</sub>	CCGACGGGGTCATTTTATTA	AAAGTCGGGTCAATCGTGTC	60	151/175
Tpap 15	(TGC) <sub>5</sub>	GACTAGCGGATGGAATGGA	GGGCAAACAAGGTGAGGATA	66	224/227
Tpap 16	(AAAT) <sub>3</sub>	CACCAAAATGAGGGAGGAAA	CCATCAATCCTTGTTGTC	58	257/261
Tpap 17	(AGAAGG) <sub>3</sub>	GGAGGATGGTGATAGGGGTT	ATGCTAACGAACAACCCGAC	65	242/254
Tpap 18	(AGTC) <sub>3</sub>	CCACGTCCTCGATTACCCT	CAAGGGACTTTTGGTTTCCA	64	188/192
Tpap 19	(ACC) <sub>5</sub>	TGGAAACCAAAAGTCCCTTG	AGAGAGAGAGAGGACTGGTGGA	54	124/127

\*T<sub>a</sub>: temperatura de anelamento; AVA: amplitude de variação do tamanho dos alelos

**Tabela 3.** Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Reagentes	Concentração	Volume ( $\mu$ L)	Concentração final
H <sub>2</sub> O MilliQ autoclavada	-	1,4	-
DNA	~ 2,5ng/ $\mu$ L	5	12,5 ng
Iniciadores ( <i>foward/reverse</i> )	0,9mM	4,3	0,26 mM
BSA (Albumina bovina)	25mg/mL	1,3	2,16 mg
Tampão da enzima	10x	1,5	1X
dNTP's	2,5 mM	1,3	216 mM
Taq-polimerase	5 unidades/ $\mu$ L	0,2	1u
Total	-	15	

Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida na concentração de 6%, com o sistema de eletroforese vertical utilizando 90 watts por cerca de uma hora e meia, com tampão TBE 1X. A coloração do gel foi realizada segundo o protocolo de Creste *et al.* (2001) e após a secagem das placas o tamanho de cada alelo foi determinado por comparação com marcador de peso molecular padrão 10 pares de bases (10 pb *ladder* Invitrogen®). O loco Tpap5 por apresentar alelo de tamanho maior que 330 pares de bases o tamanho de cada alelo foi determinado por comparação com marcador de peso molecular padrão 50 pares de bases (50 pb *ladder* Invitrogen®). Após a genotipagem de todos os indivíduos, a confirmação de cada um dos alelos foi realizada a partir de uma nova eletroforese, contendo uma amostra de todos os alelos existentes.

### 4.3 Análise estatística

#### 4.3.1 Caracterização da variabilidade genética

Foram estimados os seguintes parâmetros genéticos básicos: número médio de alelos por loco, frequências alélicas e genotípicas, heterozigosidade esperada sob condições do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ) e heterozigosidade observada (Nei 1973). A fim de conhecer o poder de discriminação individual dos locos, também foram estimadas as probabilidades de identidade genética (I) (Paetkau *et al.*, 1995) e de exclusão de paternidade (Q) (Weir, 1996), para cada loco e para o conjuntos de locos.

O número médio de alelos por loco foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. A heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) foi obtida pela razão



entre o número total de heterozigotos e o número de indivíduos. Para a sua obtenção, as proporções obtidas para cada loco foram somadas e divididas pelo número total de locos polimórficos:

$$H_o = 1 - \sum P_{ii}, \text{ onde } P_{ii} \text{ é a freqüência dos genótipos homozigotos.}$$

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foi obtida a partir das freqüências alélicas, segundo as freqüências genóticas esperadas, conforme equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com Nei (1973):

$$H_e = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r \left[ 2n \frac{\left( 1 - \sum_{j=1}^k p_{ij}^2 \right)}{(2n-1)} \right], \text{ onde } n \text{ é o número de indivíduos, } r \text{ é o número de locos, } k$$

é o número de alelos no loco  $i$  e  $p_{ij}$  é a freqüência do  $j$ -ésimo alelo do  $i$ -ésimo loco.

A Probabilidade de Exclusão de Paternidade (PE), que se refere à probabilidade de se excluir uma falsa paternidade é calculada por loco ( $Q_L$ ):

$$Q_L = \sum_u p_u (1 - p_u)^2 - \frac{1}{2} \sum_u \sum_{v \neq u} p_u^2 p_v^2 (4 - 3p_u - 3p_v), \text{ e generalizando para todos os locos, tem-se que } Q = 1 - \prod_L (1 - Q_L). \text{ Sendo } p_u \text{ as freqüências alélicas do loco } u \text{ na população e } Q \text{ a}$$

probabilidade de que pelo menos um loco do sistema permita a exclusão de um dos prováveis pais.

A Probabilidade de Identidade (PI), que é a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente em uma população terem genótipo idêntico, foi calculada segundo

$$\text{Paetkau } et \text{ al. (1998) em que: } PI = \frac{n^3(2a_2^2 - a_4) - 2n^2(a_3 + 2a_2) + n(9a_2 + 2) - 6}{(n-1)(n-2)(n-3)} \text{ na qual, } n \text{ é o}$$

número de amostras,  $a_i$  é dado por:  $\sum_j p_j^i$ , em que  $p_j$  é a freqüência do  $j$ -ésimo alelo

calculado por loco e multiplicada para todos os locos.

Foi feita a verificação da existência de alelos privados em cada subpopulação.

### 4.3.2 Estrutura genética entre subpopulações

Os coeficientes de Wright (1951) ( $\theta$ ,  $F$  e  $f$ ) foram estimados conforme proposto por Weir & Cockerham (1984), pela análise de variância das frequências alélicas. A significância estatística desse teste foi obtida a partir de randomizações e foi utilizada a correção de Bonferroni (Goudet *et al.* 1996).

O índice de fixação ou coeficiente de endogamia que estima a deficiência ou excesso de heterozigotos é calculado com base nas heterozigosidades esperada e observada (Weir, 1996). Por sua vez,  $F$  também é um coeficiente de endogamia de Wright, porém envolvendo todos os indivíduos da espécie, representada pelo conjunto de todas as subpopulações, assim,  $F$  é um estimador de correlação entre genes dentro de indivíduos (Cockerham & Weir, 1993). O estimador  $\theta$  é uma medida de diferenciação entre subpopulações e é consequência da correlação entre genes de diferentes indivíduos na mesma subpopulação (Weir & Cockerham, 1984, Cockerham & Weir, 1993), a proporção da variabilidade genética medida pelo  $\theta$ , foi estimada par a par entre as três subpopulações.

De acordo com o modelo *stepwise mutation*, a maioria das mutações que ocorrem em marcadores microssatélites envolve a adição ou subtração de uma unidade de repetição (Ohta & Kimura, 1973; Valdes *et al.*, 1993). Sendo assim, a diferenciação genética entre as populações também foi estimada pelo  $R_{ST}$  (Slatkin, 1995), um análogo ao  $\theta$ , baseado neste modelo de mutação e obtido pela análise de variância do tamanho dos alelos.

A partir do valor de  $\theta$  foi obtido uma estimativa indireta do fluxo gênico entre as três subpopulações pela equação de migração de Wright, 1951, que equivale ao número de migrantes por geração ( $Nm$ ):

$$Nm = \frac{\left( \frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)}{4}.$$

O  $F_{ST}$  foi substituído pelo  $\theta$ , conforme sugerem Cockerham & Weir (1993).

### 4.3.3 Estrutura genética espacial intrapopulacional

A caracterização da distribuição espacial dos genótipos dentro das subpopulações foi realizada a partir do coeficiente de parentesco  $F_{ij}$ , (estimador J. Nason) com base em Loiselle *et al.* 1995, entre plantas dentro das classes de distância, as classes de distância foram determinadas de forma que todas representassem um número aproximado de pares de pontos (Tabela 4). Este método se baseia na probabilidade de se amostrarem aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência. Os valores de  $F_{ij}$  foram computados conforme descrito a seguir:

$$F_{ij} = \sum_l \left[ \sum_a \left( \sum_{c_i} \sum_{c_j} (x_{lci} - p_{la})(x_{lcj} - p_{la}) / \sum_{c_i} \sum_{c_j} 1 \right) + \sum_a (p_{la}(1 - p_{la}) / (n_l - 1)) \right] / \sum_l \sum_a (p_{la}(1 - p_{la}))$$

onde,  $x_{lci}$  é uma variável indicadora ( $x_{lci} = 1$  se o alelo no cromossomo  $c$  do loco  $l$  do indivíduo  $i$  é  $a$ , caso contrário  $x_{lci} = 0$ ),  $p_{la}$  é a frequência de um alelo no loco  $l$ , na amostra de referência,  $n_l$  é o número de genes definidos numa amostra do loco  $l$  (o número de indivíduos vezes o nível de ploidia menos o número de alelos *missing*), e  $\sum_{c_i}$  representa a soma dos cromossomos homólogos do indivíduo  $i$ . Aqui, o termo envolvendo  $(n_l - 1)$  é uma correção do viés de amostragem.

Para testar a estrutura do parentesco, foi realizada uma regressão linear dos valores de  $F_{ij}$  em função da distância espacial entre os indivíduos. O intervalo de confiança dos valores dos valores de  $F_{ij}$  estimado por *jackknife* sobre os locos e também foi realizado teste com 10.000 permutações para verificar a significância do parentesco em todas as classes de distância e da regressão.

A força da estrutura genética espacial foi quantificada usando o parâmetro  $S_p = b / (F_1 - 1)$ , onde  $F_1$  é o coeficiente médio de parentesco entre os indivíduos da primeira classe de distância e  $b$  é a inclinação da regressão (Vekemans & Hardy, 2004). A dispersão de sementes foi estimada com base na vizinhança genética ( $Nb$ ) utilizando a inclinação da regressão  $b$  e o  $F_{ij}$  ( $Nb = (F_1 - 1) / b$  ou  $Nb = 1 / S_p$ ) seguindo Vekemans and Hardy (2004). As distribuições de frequências das distâncias par a par das três subpopulações foram comparadas pelo teste Kolmogorov-Smirnov.

**Tabela 4.** Classes de distância utilizadas para análises de estrutura genética espacial intrapopulacional das três subpopulações de *Tibouchina papyrus*.

Subpopulações	Classes de Distância (m)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Serra dos Pirineus	50	90	210	410	600	800	1000	1500	2000	3000	4000	4700				
Serra Dourada	70	110	210	350	1000	1500	1750	2000	2200	2600						
S. Natividade	20	50	70	100	130	150	220	400	1100	1150	1200	1300				

#### 4.3.4 Programas utilizados

Para o cálculo das estatísticas descritivas e diversidade de Nei que foram estimadas por loco e para as subpopulações foi utilizando o programa FSTA 2.9.3 (Goudet, 2002). As estatísticas-F e de  $R_{ST}$  também foram realizadas no programa FSTAT 2.9.3.

Para avaliar se a diferença entre os valores de  $\theta$  e  $R_{ST}$  é significativa, foram realizadas estimativas da média e do erro padrão por jackknife dos dois valores no programa SPAGeDI 1.2 (*Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity*) (Hardy & Vekemans, 2002).

A existência de alelos privados nas subpopulações foi determinada utilizando o programa GDA (*Genetic Data Analysis*) (Lewis & Zaykin, 2002).

As análises de Probabilidade de Exclusão de Paternidade e Probabilidade de Identidade foram realizadas utilizando o programa Identity 1.0 (Wagner & sefC, 1999).

O programa SPAGeDI 1.2 (*Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity*) (Hardy & Vekemans, 2002) também foi utilizado para verificar a existência de estrutura genética espacial em cada subpopulação.

A confecção dos correlogramas foi realizada no programa STATISTICA 7.1.

O teste Kolmogorov-Smirnov foi calculado no programa SYSTAT<sup>®</sup> Software, Inc. 2007.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da variabilidade genética

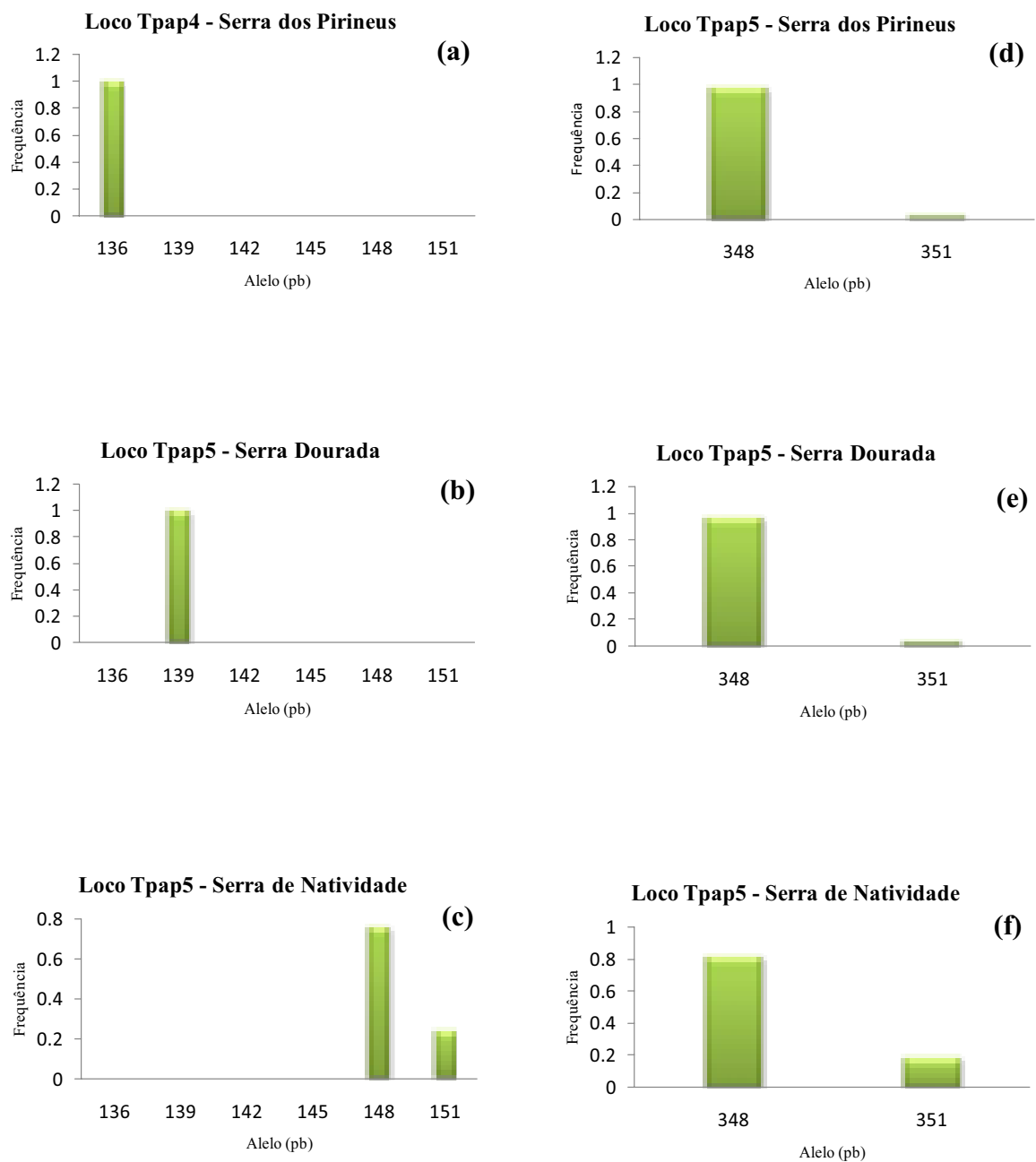
Para os dez locos analisados, o número total de alelos foi igual a 34, variando entre 2 e 9 com uma média de 3,4 alelos por loco. A amplitude de variação no tamanho dos alelos em pares de base foi observada entre 124 a 351. Os valores de heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho), considerando o conjunto de locos foram iguais a 0,402 e 0,140 (Tabela 5). As probabilidades combinadas de identidade (I) e de exclusão de paternidade (Q) foram iguais a 0,00007 e 0,918, respectivamente (Tabela 5).

A análise de alelos privados revelou a presença de 19 alelos privados em 7 dos locos analisados, representando 55,88% do total de alelos em 70% dos locos. A subpopulação da Serra Dourada foi a que apresentou o maior número de alelos privados, totalizando 9 alelos privados, sendo 6 deles pertencentes ao loco Tpap12; a subpopulação da Serra dos Pirineus foi a que apresentou o menor número de alelos privados, com apenas 2 alelos presentes em dois locos diferentes (Tabela 6).

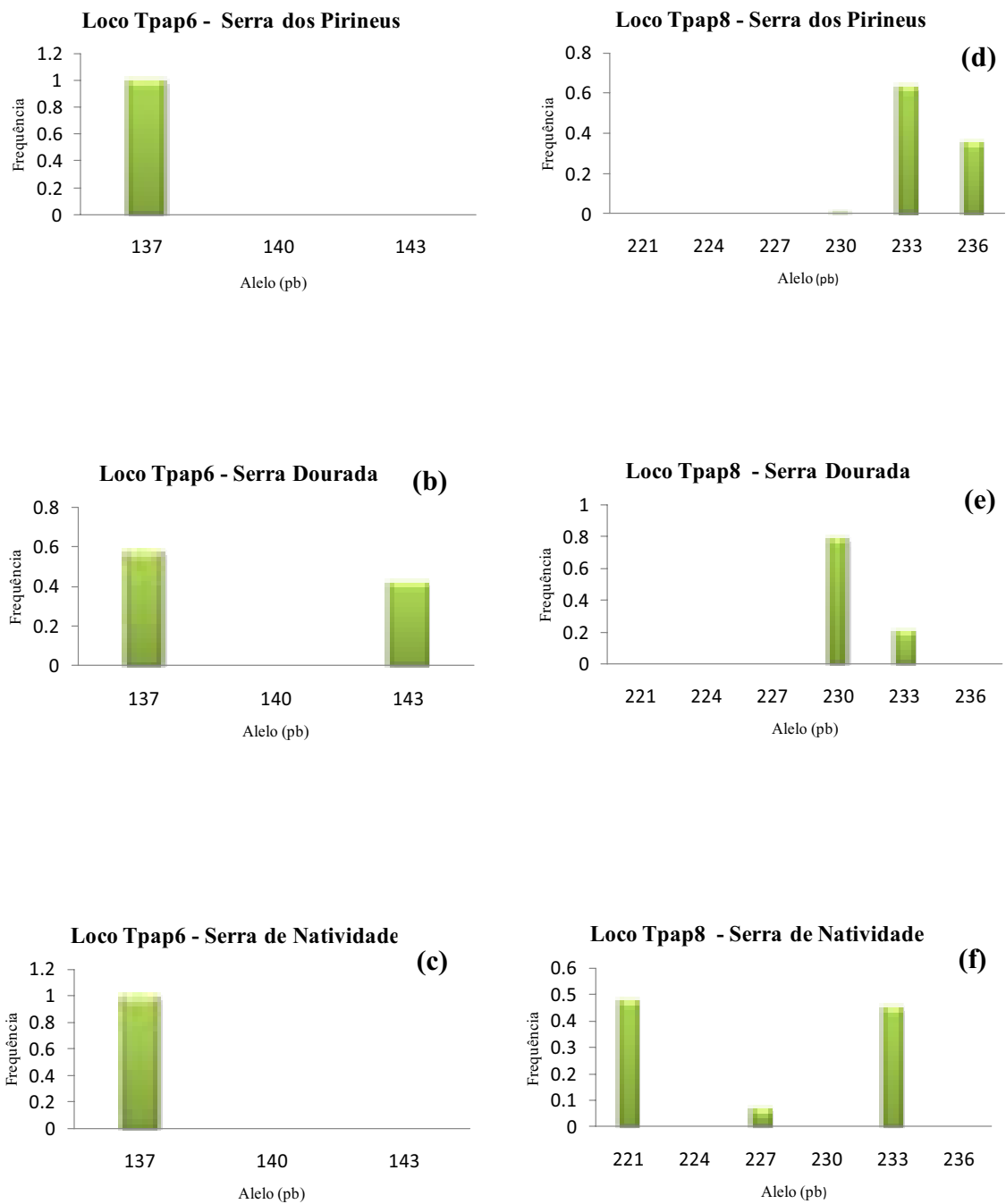
**Tabela 5.** Relação dos locos com seus respectivos números de indivíduos analisados (N), heterozigosidade esperada (He), observada (Ho), probabilidade de identidade (I) e probabilidade de exclusão de paternidade (Q).

Locos	N	N <sub>A</sub>	He*	Ho*	I	Q
Tpap4	446	4	0,671	0,128	0,16516	0,412
Tpap5	468	2	0,160	0,119	0,71860	0,073
Tpap6	453	2	0,110	0,068	0,79789	0,052
Tpap8	421	5	0,671	0,382	0,15104	0,436
Tpap12	459	9	0,601	0,316	0,21848	0,349
Tpap15	460	2	0,278	0,045	0,56074	0,119
Tpap16	473	2	0,391	0,186	0,44744	0,157
Tpap17	467	3	0,395	0,139	0,40222	0,205
Tpap18	464	2	0,245	0,000	0,60128	0,107
Tpap19	474	2	0,499	0,126	0,37614	0,186
<b>Global</b>	-	<b>3,4</b>	<b>0,402</b>	<b>0,140</b>	<b>7,1x10<sup>-5</sup></b>	<b>0,918</b>

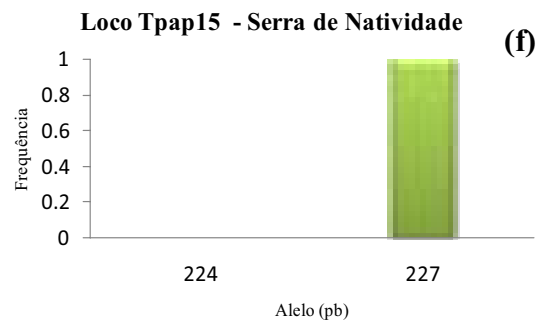
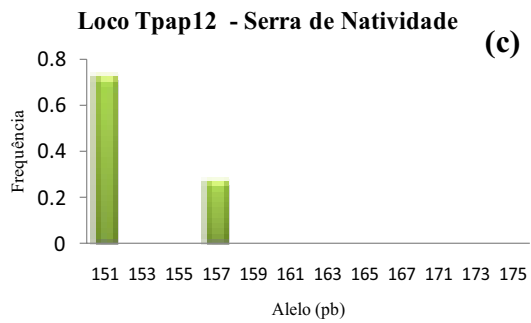
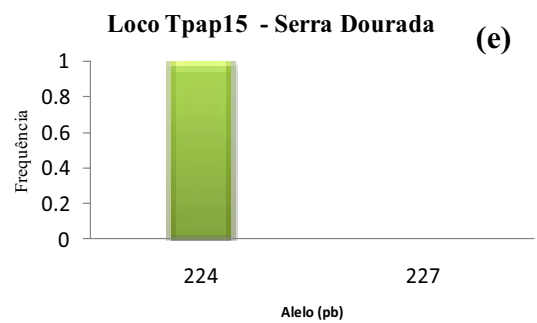
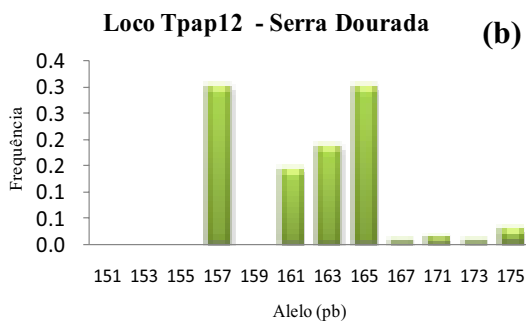
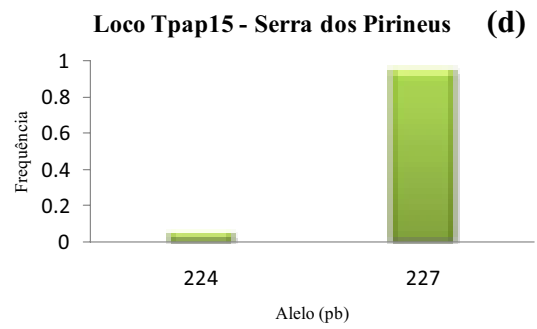
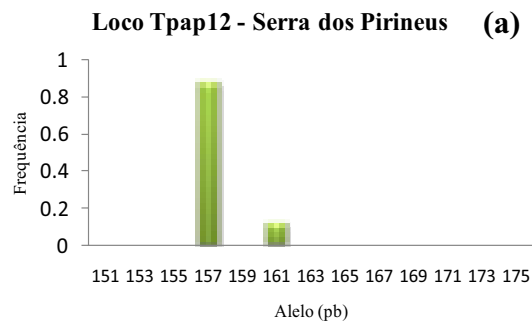
\*Valores significativos  $p \leq 0,0017$ , correção de *Bonferroni* para o valor nominal de 0,05.



**Figura 6.** Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap4 (a, b, c) e Tpap5 (d, e, f) nas três subpopulações de *Tibouchina papyrus*.

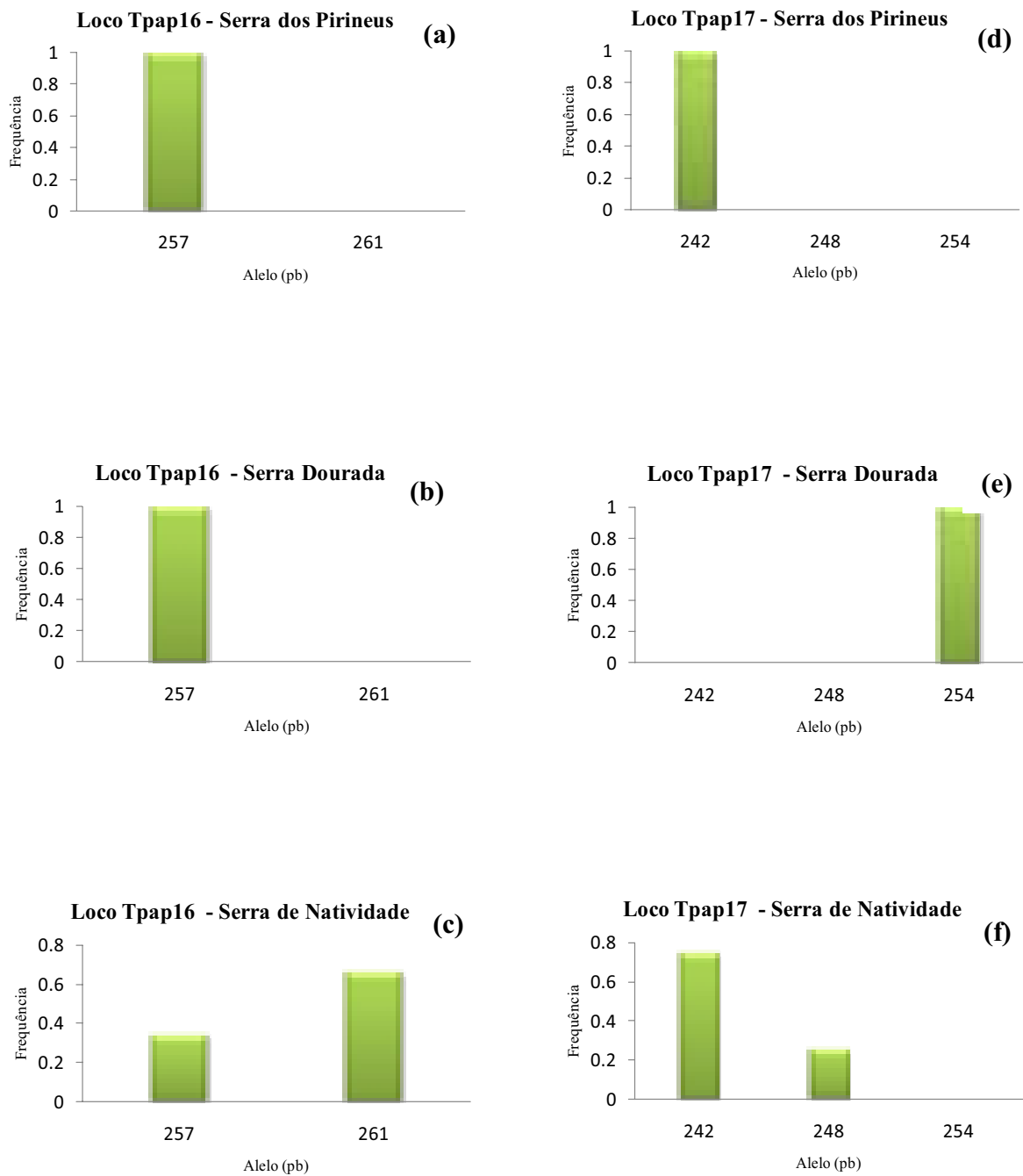


**Figura 7.** Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap6 (a, b, c) e Tpap8 (d, e, f) nas três subpopulações de *Tibouchina papyrus*.

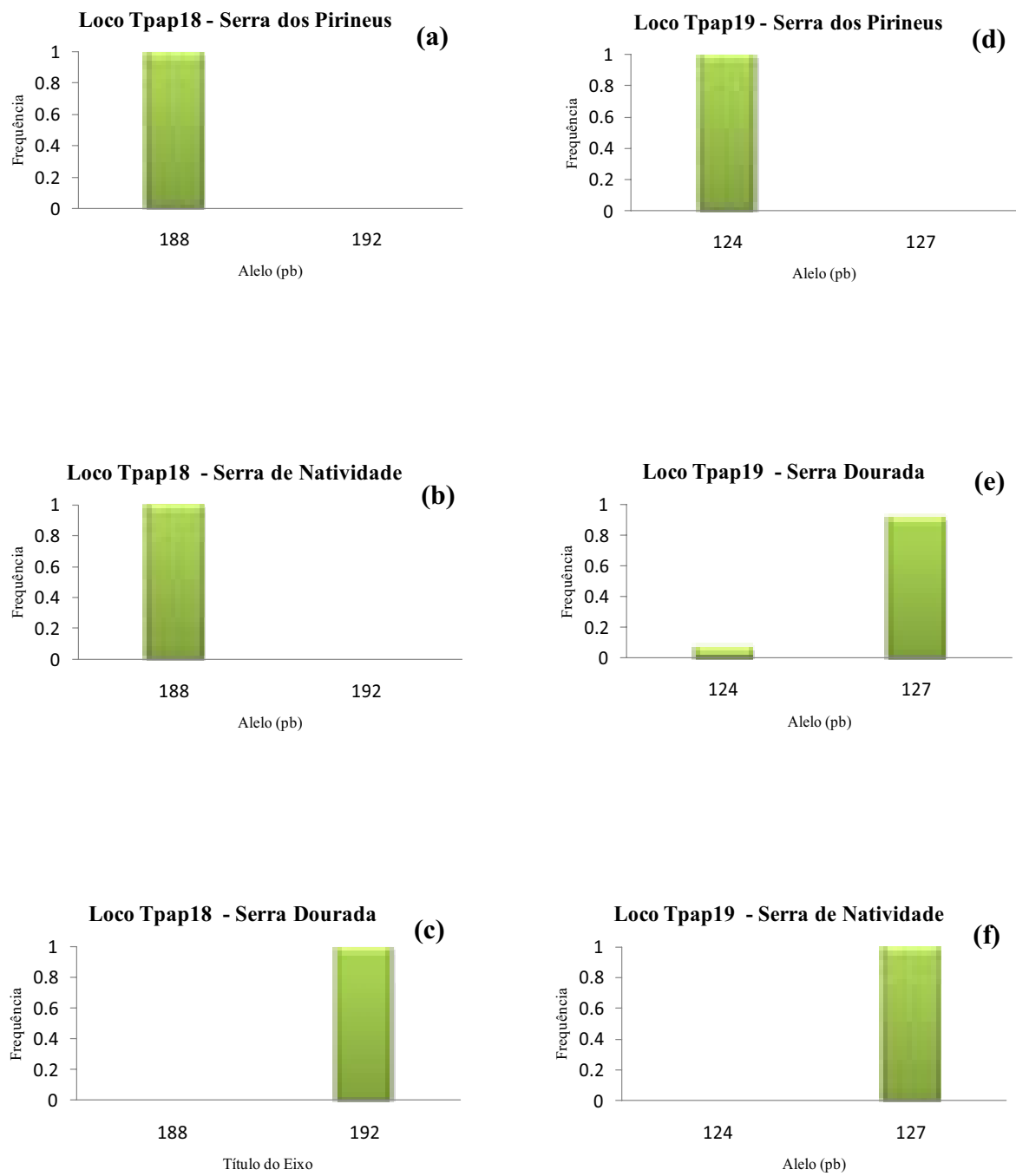


**Figura 8.** Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap12 (a, b, c) e Tpap15 (d, e, f) nas três subpopulações de *Tibouchina papyrus*.





**Figura 9.** Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap16 (a, b, c) e Tpap17 (d, e, f) nas três subpopulações de *Tibouchina papyrus*.



**Figura 10.** Distribuição das frequências alélicas nos locos Tpap18 (a, b, c) e Tpap19 (d, e, f) nas três subpopulações de *Tibouchina papyrus*.

**Tabela 6.** Relação dos locos que apresentaram alelos privados, com os respectivos alelos privados, a subpopulação na qual o alelo está presente e sua frequência alélica.

Loco	Subpopulações			
	Alelos Privados	Frequências Alélicas		
		Serra dos Pirineus	Serra Dourada	Serra de Natividade
Tpap4	136	1,000	-	-
	139	-	1,000	-
	148	-	-	0,758
	151	-	-	0,241
Tpap 6	143	-	0,420	-
Tpap 8	221	-	-	0,477
	227	-	-	0,068
	236	0,355	-	-
Tpap 12	151	-	-	0,728
	163	-	0,189	-
	165	-	0,303	-
	167	-	0,007	-
	171	-	0,015	-
	173	-	0,007	-
	175	-	0,030	-
Tpap 16	161	-	-	0,659
Tpap 17	248	-	-	0,251
	254	-	1,000	-
Tpap 18	192	-	-	1,000

## 5.2 Estrutura e divergência genética entre subpopulações

O número médio de alelos, por subpopulação, variou entre 1,5 na Serra dos Pirineus e 2,1 na Serra Dourada (Tabela 7). Foram encontrados valores de ( $f$ ) significativos nas subpopulações Serra dos Pirineus e Serra Dourada, o que sugere que existe endogamia, ou seja, não existe panmixia dentro dessas subpopulações. Na subpopulação da Serra de Natividade foi observado valor de ( $f$ ) não significativo, ou seja, as frequências alélicas estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro dessa subpopulação.

**Tabela 7.** Variabilidade genética nas três subpopulações de *Tibouchina papyrus*, baseada em dez marcadores microssatélites. (N) número de indivíduos; (A) número médio de alelos; heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e índice de fixação (f).

População	N	A	He	Ho	f
Serra dos Pirineus	216	1,5	0,205	0,155	0,246
Serra Dourada	66	2,1	0,357	0,280	0,216
Serra de Natividade	192	1,8	0,409	0,386	0,057 <sup>NS</sup>

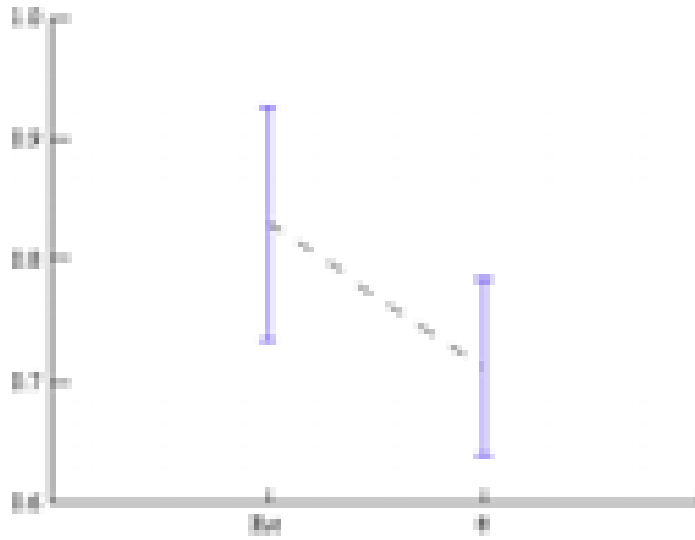
<sup>NS</sup> = Não Significativo,  $p > 0,00167$ , correção de *Bonferroni* para o valor nominal de 0,05.

O valor global de F foi significativo e igual a 0,748, sugerindo que a variabilidade genética deve estar estruturada nas três subpopulações. O valor global obtido para  $\theta$  foi significativo e igual a 0,712, variando nos locos entre 0,114 (Tpap 5) e 1 (Tpap 18), indicando uma elevadíssima diferenciação genética entre essas subpopulações. O valor global de  $R_{ST}$  foi igual a 0,831. No entanto, para a maioria dos locos, os valores de  $R_{ST}$  foram semelhantes ou iguais aos valores de  $\theta$ , não diferindo significativamente entre eles (Figura 12). O número de migrantes por geração ( $Nm$ ), estimado a partir do valor de  $\theta$ , foi igual a 0,102.

**Tabela 8.** Análise de variância das frequências alélicas e análise de variância do tamanho dos alelos para os locos microssatélites em três subpopulações de *Tibouchina papyrus*.

Loco	f	$\theta$	F	$R_{ST}$
Tpap 4	0,810	0,855	0,872	0,989
Tpap 5	0,253	0,114	0,286	0,114
Tpap 6	0,380	0,504	0,501	0,504
Tpap 8	0,430	0,393	0,517	0,562
Tpap 12	0,474	0,513	0,579	0,739
Tpap 15	0,836	0,898	0,893	0,898
Tpap 16	0,525	0,654	0,646	0,654
Tpap 17	0,647	0,728	0,747	0,907
Tpap 18	1,000	1,000	1,000	1,000
Tpap 19	0,975	0,976	0,984	0,976
<b>Global</b>	<b>0,652</b>	<b>0,712</b>	<b>0,748</b>	<b>0,831</b>

Correção de *Bonferroni* para o valor nominal de 0,05.



**Figura 11.** Comparação entre os valores globais estimados para  $R_{ST}$  e  $\theta$  pela análise das médias e desvio padrão.

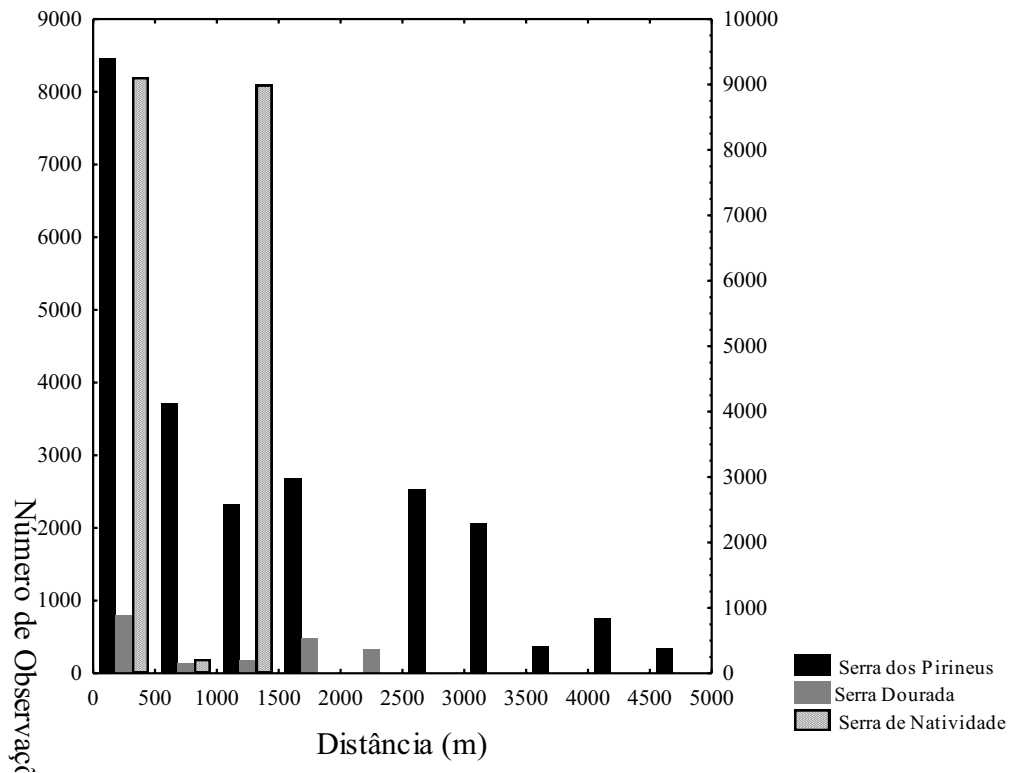
A análise de divergência genética ( $\theta$ ) par a par entre as subpopulações indicou que as subpopulações Serra dos Pirineus e Serra de Natividade são as mais similares geneticamente, exibindo um valor de  $\theta$  igual a 0,655. O maior valor de  $\theta$  encontrado foi entre as subpopulações de Serra dos Pirineus e Serra Dourada (0,843) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Divergência genética ( $\theta$ ) entre as três subpopulações de *Tibouchina papyrus*.

	Serra dos Pirineus	Serra Dourada	Serra de Natividade
Serra dos Pirineus	0,000		
Serra Dourada	0,843	0,000	
Serra de Natividade	0,655	0,691	0,000

### 5.3 Estrutura genética espacial intrapopulacional

A frequências de distribuição espacial par a par dos indivíduos amostrados diferiu significativamente entre as três subpopulações (Figura 13). Para Serra dos Pirineus, a distância média entre as árvores é igual a 1.775 m (SD = 1.235 m) e a maioria dos indivíduos exibiu uma distância par a par menor que 2.000 m e a maior distância par a par observada foi acima de 4.000 m. Para Serra Dourada a distância média entre as árvores foi 1.030 m (SD = 840 m), exibindo uma distribuição menos agregada dos indivíduos, diferente das outras subpopulações. Os indivíduos da Serra de Natividade apresentaram distribuição mais agregada do que as outras duas subpopulações, com média igual a 650 m (SD = 487,5 m).



**Figura 12.** Distribuição das distâncias par a par entre indivíduos das três subpopulações de *T. papyrus* (Teste Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,001$ ).

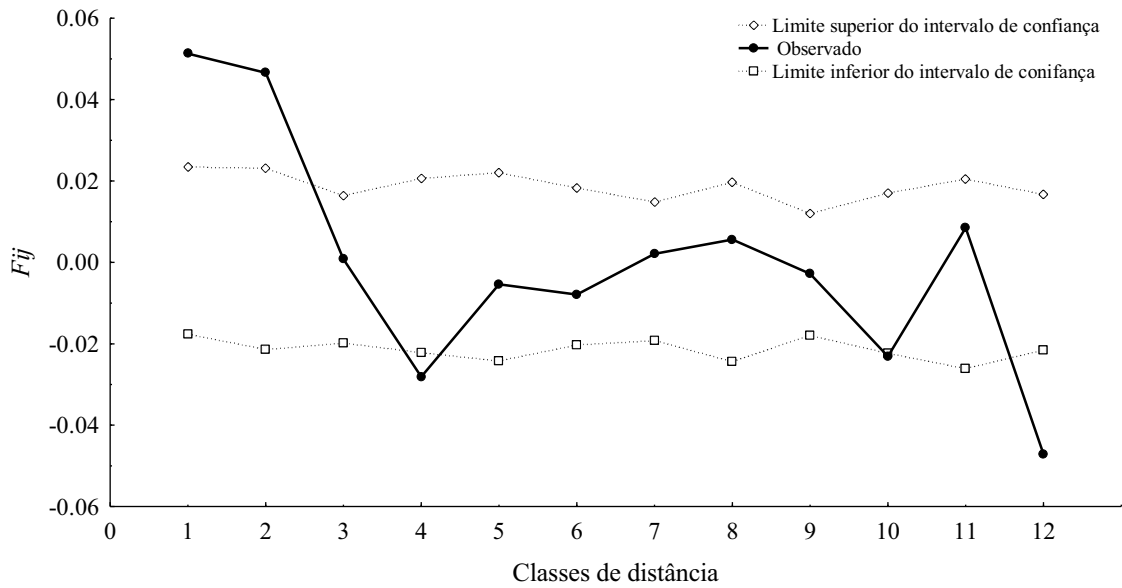
O correlograma obtido para os indivíduos da Serra dos Pirineus (Figura 14) apresentou um padrão clinal de EGE fraco, mas exibindo valores positivos e significativos do coeficiente de parentesco nas primeiras classes de distâncias (até 90 m) e negativos e significativos na

última classe de distância (cerca de 4000 m). Sendo assim, a análise do correlograma completo mostra que o parentesco está fracamente relacionado com o logaritmo de distância ( $R^2 = 0,002$ ;  $p < 0,001$ ). Para esta subpopulação o tamanho do grupo de vizinhança genética ( $N_b$ ) foi igual a 72,93 (Tabela 10).

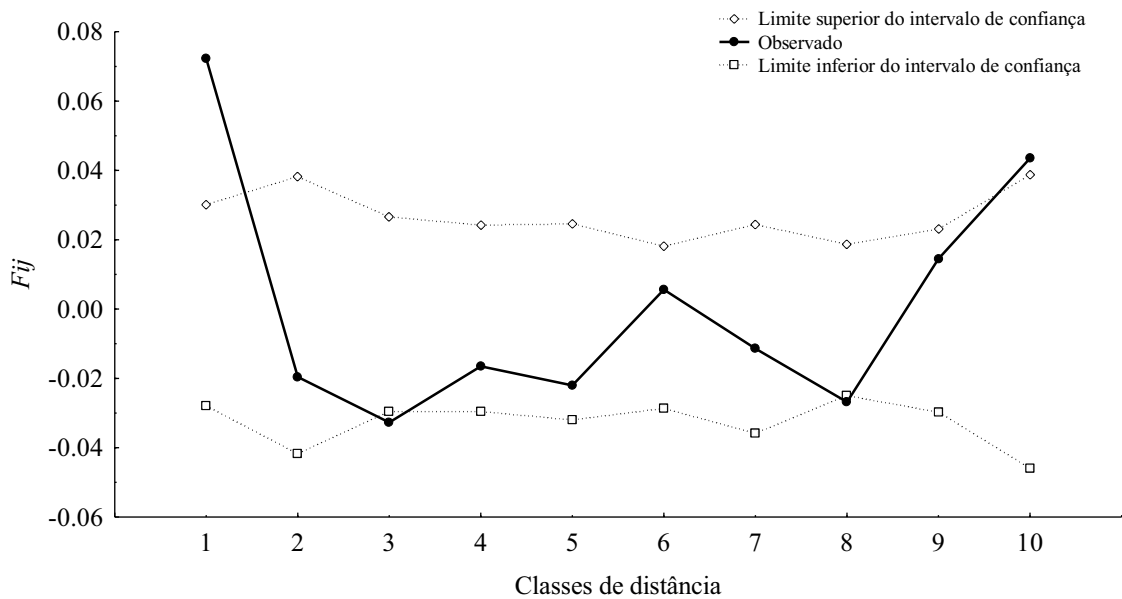
A análise de EGE na Serra Dourada (Figura 15) revelou que o coeficiente de parentesco diminui fortemente após a primeira classe de distância (70 m), entretanto, o correlograma total não apresentou um padrão clinal, sendo o coeficiente de parentesco pouco relacionado com o logaritmo de distância geográfica ( $R^2 = 0,003$ ;  $p < 0,05$ ). A vizinhança genética ( $N_b$ ) foi igual á 105,70 (Tabela 10).

No correlograma dos indivíduos da Serra de Natividade (Figura 16) apresentou um padrão clinal com correlação entre o coeficiente de parentesco e distância positiva e significativa até a oitava classe de distância, diminuindo fortemente após 220 m, apresentando correlação negativa e significativa nas últimas classes. A análise do correlograma nessa subpopulação revelou que o parentesco está relacionado com o logaritmo de distância ( $R^2 = 0,191$ ;  $p < 0,001$ ). O valor de vizinhança genética foi 11,88 (Tabela 10).

A estrutura genética espacial intrapopulacional apresentou-se fraca para as subpopulações Serra dos Pirineus e Serra Dourada, com baixos níveis de  $S_P$ . A análise da Serra de Natividade foi a que revelou o maior valor de  $S_P(0,0841)$  (Tabela 10).

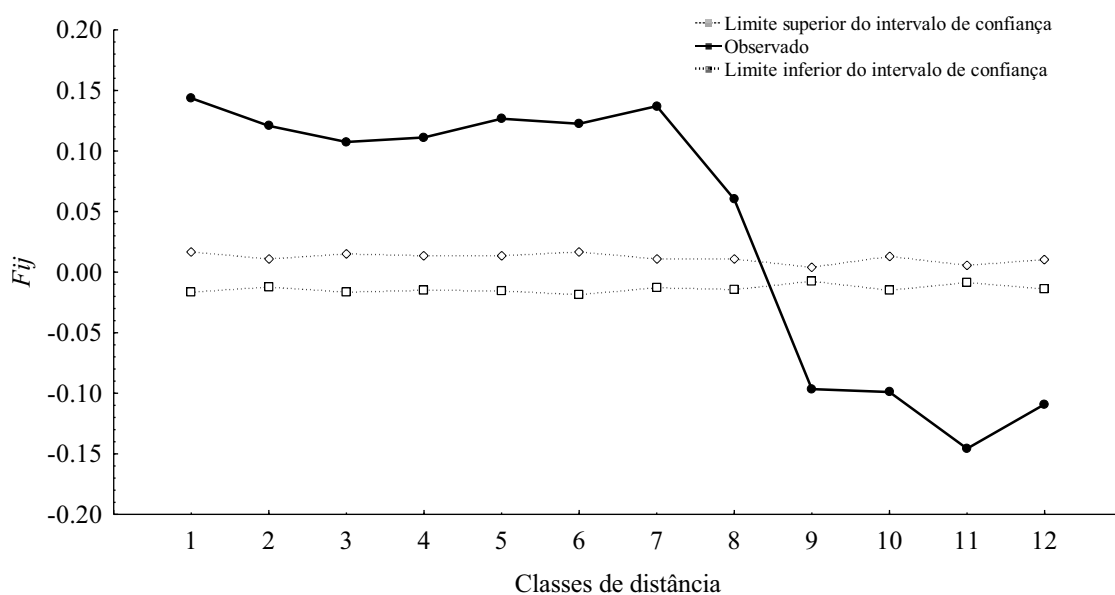


**Figura 13.** Correlograma entre coeficiente de parentesco e classe de distância de indivíduos da Serra dos Pirineus. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%; 10.000 permutações).



**Figura 14.** Correlograma entre coeficiente de parentesco e classe de distância de indivíduos da Serra de Dourada. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%; 10.000 permutações).





**Figura 15.** Correlograma entre coeficiente de parentesco e classe de distância de indivíduos da Serra de Natividade. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%; 10.000 permutações).

**Tabela 10.** Comparação da estrutura genética espacial intrapopulacional e vizinhança genética entre as três subpopulações.  $F_I$  – valor de  $F_{ij}$  (intra grupo);  $b$  – inclinação da regressão;  $S_p$  – parâmetro de força da estrutura genética espacial;  $N_b$  – vizinhança genética.

Subpopulações	$F_I^*$	$b^*$	$S_p$	$N_b$
Serra dos Pirineus	0,060 ± 0,069	-0,0129	0,0137	72,93
Serra Dourada	0,072 ± 0,030	-0,0089	0,0095	105,70
Serra de Natividade	0,143 ± 0,064	-0,0721	0,0841	11,88

\* Valores significativos;  $p < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Variabilidade e estrutura genética

De uma maneira geral o número de alelos observados foi relativamente baixo, considerando o que deve ser esperado para locos microssatélites que são potencialmente multialélicos (Goldstein & Schlötterer, 2001; Ellegren, 2004). Entretanto, esta pequena quantidade de alelos pode estar relacionada com o tamanho das regiões microssatélites que estão sendo avaliadas nesses locos. Geralmente os locos que apresentam um número maior de repetições tendem a apresentar um maior número de alelos (Weber, 1990), o que sugere que em regiões microssatélites mais longas espera-se que a mutação ocorra com maior frequência do que em regiões microssatélites menores (Harr & Schlötterer, 2000; Ellegren, 2000). Isso foi observado para *Tibouchina papyrus*, onde os dois locos mais polimórficos (Tpap12 e Tpap8) também são os locos que possuem maior número de repetições (seis).

Por outro lado, se for considerado o tamanho dos motivos de repetição destas regiões, que na sua maioria são trinucleotídeos, seria esperado um maior número de alelos, uma vez que espera-se altas taxas de mutação em motivos menores (Ellegren, 2004). No entanto, existem muitos modelos de mutação para essas regiões microssatélites do genoma (Ellegren, 2004) e a variação diferente do esperado em função do tamanho, também tem sido observada em locos microssatélites de alguns outros organismos (Van Oppen *et al.*, 2000), tais como Salmonídeos (Angers & Bernatchez, 1997) e a espécie de formiga *Camponotus consobrinus* (Crozier *et al.*, 1999).

A probabilidade de exclusão de paternidade (Q), que se refere à probabilidade de excluir uma falsa paternidade apresentou valor combinado igual 0,918, que pode ser considerado de moderado a alto (Moreira *et al.*, 2009), pois trata-se de um valor que mede o poder de exclusão do sistema, por exemplo, um teste de paternidade, cujo valor ideal é de 0,99999 (Collevatti *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2006). Outra medida importante em análises de vínculo genético é a probabilidade de identidade (I), que é a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso em uma população possuírem genótipos idênticos. A (I) apresentou uma probabilidade de identidade combinada igual a  $7,1 \times 10^{-5}$ , valor considerado bom para este tipo de análise, isso porque a probabilidade de identidade combinada deve ser

praticamente nula para demonstrar que o microssatélite é um ótimo marcador para discriminar os indivíduos (Collevatti *et al.*, 1999).

Sabe-se que a presença de alelos privados em algumas populações pode ser indicativa de restrição ao fluxo gênico (Slatkin, 1985). O elevado número de alelos privados encontrado para *T. papyrus*, provavelmente está relacionado com este fato, uma vez que a mesma apresenta uma distribuição extremamente disjunta e restrita a apenas três localidades distantes geograficamente a ponto de não ser possível a existência de fluxo gênico atual. Sendo assim, espera-se uma elevada divergência genética entre as subpopulações, causada pela atuação da deriva genética ao longo de sucessivas gerações. De fato, foram encontrados elevados valores de distância genética entre as subpopulações de *T. papyrus* analisadas.

Segundo Loveless & Hamrick (1984), fatores ecológicos afetam a reprodução e a dispersão e são particularmente importantes na determinação da estrutura genética. Os padrões de estruturação genética dentro e entre as subpopulações de *T. papyrus* mostram-se congruentes com as características ecológicas da espécie. *T. papyrus* é considerada como uma planta autocompatível, o que pode resultar em níveis mais elevados de endogamia. Os valores significativos encontrados nas subpopulações da Serra dos Pirineus e Serra Dourada indicaram que as frequências alélicas na subpopulação não estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, existe endogamia dentro dessas subpopulações. O valor de  $f$  não significativo na subpopulação de Serra de Natividade revela que não existe diferença significativa entre os valores de heterozigosidade esperada e observada, o que indica que as frequências alélicas na subpopulação estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, o acasalamento ocorre ao acaso dentro da subpopulação. O valor de  $f$  encontrado na Serra de Natividade provavelmente é resultado do tamanho populacional, já que esta subpopulação apresenta um grande número de indivíduos, o que pode evitar a ocorrência de acasalamento entre indivíduos aparentados.

O aumento da endogamia pode ocasionar redução dos valores adaptativos (*fitness*) individuais e adaptabilidade populacional, causando redução nas taxas de reprodução e aumento nas taxas de mortalidade (Eckert *et al.*, 2008) e, conseqüentemente, podem levar estas duas subpopulações à extinção.

O índice de fixação total (F) foi igual a 0,748 e significativamente diferente de zero, o que indica uma preferência de cruzamentos dentro das subpopulações em relação aos cruzamentos entre as subpopulações (fluxo gênico), que é decorrente da distribuição não

aleatória dos alelos entre as subpopulações, ou seja, há estruturação da variabilidade genética. De acordo com Wright (1951), valores de  $\theta$  entre 0 e 0,15 indicam fraca diferenciação genética, valores entre 0,15 e 0,25 indicam diferenciação moderada e valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação. Sendo assim, as subpopulações de *T. papyrus* podem ser consideradas como altamente estruturadas, com uma diferenciação genética muito alta entre as três subpopulações ( $\theta = 0,712$ ), isso significa que aproximadamente 71% da variação genética encontra-se entre as subpopulações e, conseqüentemente, 29% desta variação ocorre dentro das subpopulações.

O número de migrantes por geração ( $Nm$ ) foi baixo e igual a 0,102, confirmando a hipótese de ausência de fluxo gênico atual. Sendo assim, como o valor de  $Nm$  foi menor que 1, espera-se que os efeitos da migração (fluxo gênico) não sejam suficientes para contrapor os efeitos da deriva genética (Wright, 1951), favorecendo, assim, um aumento na divergência genética entre as subpopulações. De acordo com Smouse & Sork (2004), o valor do fluxo gênico estimado a partir da divergência genética reflete o fluxo que ocorreu durante um longo período. Portanto, o fluxo gênico atual entre as três subpopulações da espécie *T. papyrus* deve ser ainda menor, já que elas estão geograficamente isoladas.

Quanto às estimativas de  $\theta$  e  $R_{ST}$ , verificou-se que não houve diferença significativa entre os dois valores, o que também foi encontrado para outras espécies de plantas tropicais (Loveless *et al.*, 1998; Lemes *et al.*, 2003; Zucchi *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2009). Segundo Hardy *et al.* (2003b) quando os valores de  $\theta$  e  $R_{ST}$  não se diferem ( $\theta = R_{ST}$ ) indica que o tamanho dos alelos não contribui com informações sobre a diferenciação entre populações.

O padrão de alto nível de diferenciação entre as subpopulações observado para *T. papyrus* não é o comumente encontrado para outras espécies de plantas (Collevatti *et al.*, 2001; Lemes *et al.*, 2003; Zucchi *et al.* 2003; Moreira *et al.*, 2009). No entanto, a maioria dessas espécies avaliadas apresenta uma distribuição geográfica mais ampla. Rossi *et al.*, 2009, estudaram a espécie *Psychotria ipecacuanha* que também apresenta distribuição disjunta, e encontraram alto valor de diferenciação similar ao da espécie *T. papyrus* ( $\theta^B = 0,683$ ).

As subpopulações mais próximas geograficamente (Serra dos Pirineus e Serra Dourada), que estão distantes 170 km apresentaram o maior valor de  $\theta$  (0,843), enquanto que as subpopulações (Serra dos Pirineus e Serra de Natividade) que estão a uma distância de 520 km apresentaram o menor valor de  $\theta$  (0,655). As subpopulações que estão mais distantes

geograficamente, 587 km (Serra Dourada e Serra de Natividade) apresentaram o valor  $\theta$  igual a 0,691.

Uma das hipóteses para explicar como os organismos que são intimamente relacionados, estão localizados, atualmente, em amplitudes amplamente difundidas geograficamente é que seus ancestrais ocorreram em partes da crosta terrestre que antes eram unidas, mas posteriormente se separaram (Brown & Lomolino, 2006). Marcadores do genoma nuclear sofrem recombinação, fator que impede a detecção de eventos demográficos mais antigos. Sabendo que eventos históricos como expansão, fragmentação e efeito gargalo, são fatores determinantes da estrutura genética atual dessas subpopulações (Avice, 2000), torna-se importante a avaliação de dados gerados também a partir do genoma cloroplastidial, pois permita testar hipóteses biogeográficas mais específicas e verificar as influências de eventos geológicos que podem ter determinada a estrutura genética atual da espécie *T. papyrus*.

Dentro desse contexto, Castro e colaboradores (2010) realizaram um estudo filogeográfico da espécie *T. papyrus*, a partir de análises regiões de DNA cloroplastidiais não codificantes, onde foi estimado o tempo de coalescência entre as mesmas subpopulações de *T. papyrus* avaliadas neste estudo. Os resultados encontrados corroboraram com a análise de agrupamento apresentada neste estudo. O ancestral comum mais recente divergiu em dois clados há cerca de 293.430 anos antes do presente, separando o grupo Serra Dourada do grupo Serra dos Pirineus e Serra de Natividade. Recentemente, houve então a divergência entre as subpopulações de Serra dos Pirineus e Serra de Natividade, aproximadamente 201.081 anos antes do presente. A distribuição disjunta apresentada atualmente pela espécie *T. papyrus* deve representar uma relíquia climática.

Criada em 1992, a CBD (*Convention on Biological Diversity*) apresenta a biodiversidade como um conceito hierárquico, composto de três níveis primários de organização a serem protegidos: genes, espécies e ecossistemas (MMA, 2000). Em um contexto de conservação biológica, o nível de fluxo gênico entre populações de plantas da mesma espécie é importante no que diz respeito à manutenção da espécie. Segundo Frankham *et al.* (2008), em espécies que apresentam baixo fluxo gênico, onde as populações se diferenciaram por deriva genética, essas populações podem ser designadas como ESUs separadas, ainda que não sejam adaptativamente diferentes.

Assim, considerando a alta divergência genética entre as subpopulações de *T. papyrus* encontrada nesse trabalho e o não compartilhamento de haplótipos entre as subpopulações,

formando assim três grupos monofiléticos, resultado do estudo filogenético de Castro *et al.* (2010), as três subpopulações de *T. papyrus* podem ser tratadas com três diferentes ESUs. Desta forma, assumem-se formas independentes para o manejo e conservação de cada subpopulação. Assim, programas visando uma possível restauração florestal devem contemplar os genótipos de cada ESU para que a espécie mantenha o potencial evolutivo e não haja comprometimento do futuro da espécie.

Duas subpopulações de *T. papyrus* (Serra dos Pirineus e Serra Dourada) estão localizadas em Parques Estaduais, ainda assim é uma espécie que pode ser considerada ameaçada, por apresentar endemismo a um habitat altamente instável, que sofre altos níveis de perturbação causada pelo fogo durante a estação seca e por modificações edáficas durante a estação chuvosa. Essas perturbações podem ser altamente variáveis entre os habitats locais e pode causar alterações súbitas no tamanho da população, fazendo com que o tamanho e a densidade populacional de *T. papyrus* seja muito variável no espaço e ao longo dos anos (Collevatti *et al.*, 2010). Assim, existe a necessidade de implantação de uma unidade de conservação na Serra de Natividade, com o objetivo de prevenir a perda de uma parte considerável da variabilidade genética existente para a espécie.

## **6.2 Estrutura genética espacial intrapopulacional**

A existência de autocorrelação espacial pouco intensa é plausível para espécies que apresentam dispersão anemocórica pelo efeito causado pelo fluxo gênico a partir de sementes dispersas em longas distâncias. Segundo Kalisz *et al.* (2001) quando a dispersão do pólen é localizada, mas a semente é dispersa a longa distância, espera-se que não existirá EGE. A dispersão de sementes pelo vento parece ser decisiva para determinação dos correlogramas produzidos nas três áreas de ocorrência de *T. papyrus*, já que o fluxo gênico via semente deve estar ocorrendo em quantidade suficiente para evitar a diferenciação das frequências alélicas locais nas subpopulações da Serra dos Pirineus e Serra Dourada. A presença de EGE na subpopulação da Serra de Natividade se deve provavelmente a geomorfologia da Serra, formando uma divisão geográfica dos indivíduos, com dois grupos isolados, um localizado sob a Serra e o outro abaixo dela, sendo assim, a dispersão pelo vento não ocorre de forma suficiente para homogeneizar as frequências alélicas dentro dessa subpopulação.

Os valores de  $f$  estimados para as três subpopulações não foram congruentes com a análise de estrutura espacial. Os valores significativos de  $f$  encontrados nas subpopulações da Serra dos Pirineus e Serra Dourada poderiam indicar que o modo de dispersão exerce um efeito de isolamento de distância, onde indivíduos que estão mais próximos espacialmente apresentariam valores positivos e significativos de coeficiente de parentesco, o que não foi observado nos correlogramas das duas subpopulações. Em Serra de Natividade o valor de  $f$  não diferente de zero poderia indicar que o modo de dispersão está exercendo efeito homogeneizador na variabilidade genética intrapopulacional, dificultando assim formação de grupos de vizinhança muito estruturados espacialmente, entretanto isso não foi observado na subpopulação, já que o correlograma revelou a presença de estrutura genética espacial, onde indivíduos que estão mais próximos espacialmente apresentaram valores positivos e significativos de coeficiente de parentesco.

De acordo com Bizoux *et al.*, 2009, a ausência de EGE pode ser também consequência direta de ambientes mais abertos (Horn *et al.*, 2001), o que também se aplica à espécie *T. papyrus* que ocorre no cerrado rupestre, onde o vento pode promover a dispersão de sementes a longas distâncias.

Vários estudos têm revelado EGE dentro de populações de espécies arbóreas (Martins *et al.*, 2006; Bittencourt & Sebbenn, 2007; Bittencourt & Sebbenn, 2008; Born *et al.*, 2008; Collevatti *et al.*, 2010). Alguns têm relatado a existência de uma fraca EGE (Loiselle *et al.*, 1995, Jones & Hubbell, 2006; Bizoux *et al.*, 2009; Collevatti *et al.*, 2010), enquanto outros não têm detectado a existência de EGE (Doligez & Joly, 1997, Epperson & Alvarez-Buylla, 1997; Gonçalves *et al.*, 2010). Essa variação pode ocorrer em função de diferentes fatores ecológicos e genéticos operando nas populações naturais das diferentes espécies, aliados aos diferentes métodos de amostragem espaço-temporal e procedimentos de análises estatísticas (Smouse & Peakall, 1999; Vekemans & Hardy, 2004).

A EGE das subpopulações de *T. papyrus*, medida pela estatística  $S_p$  (valor médio = 0,035), está entre os valores que têm sido observados para espécies de plantas, valores esses que variaram entre  $S_p = 0,174$  para a espécie *Phaseolus lunatus* e  $S_p = 0,005$  para a espécie *Neolitsea sericea* (Vekemans & Hardy, 2004). Os valores de  $S_p$  e  $N_b$  são inversamente proporcionais ( $N_b = 1/S_p$ ), pois quanto maior a força da EGE, menor a vizinhança genética, ou seja, menor o número de indivíduos que estão se cruzando ao acaso.

Apesar da fraca EGE intrapopulacional encontrada em duas subpopulações de *T. papyrus*, foi observado, baseado nos correlogramas de parentesco das mesmas, valores positivos e significativos nas primeiras classes de distância, indicando algum grau de parentesco entre os indivíduos que estão mais próximos espacialmente. As distâncias representadas por estas classes fornecem uma importante informação para o manejo dessas subpopulações, pois indicam um distanciamento mínimo entre os indivíduos a serem amostrados. Caso exista a intenção de coletar amostras para compor coleções de germoplasma ou implantação de programas de recuperação de áreas degradadas, essa informação otimiza a amostragem com o intuito de obter maior representatividade da variabilidade genética da espécie com o menor número de indivíduos. Segundo Diniz-Filho & Telles (2002) é recomendado utilizar o intercepto do correlograma para definir o tamanho do intervalo de distância como critério de amostragem, evitando a coleta de indivíduos pertencentes à mesma área de vizinhança genética.



## 7. CONCLUSÃO

- Existe um baixo polimorfismo nas dez regiões microssatélites avaliadas no genoma de *T. papyrus*;
- A diferenciação genética encontrada entre as subpopulações de *T. papyrus* foi muito elevada, sugerindo ausência de fluxo gênico atual entre elas, fazendo com que cada subpopulação seja considerada uma ESU.
- Existe uma fraca EGE dentro de duas subpopulações de *T. papyrus*, compatível com o modo de dispersão de sementes da espécie (anemocoria) e a presença de EGE em uma subpopulação se deve provavelmente, a geomorfologia da Serra.
- O intercepto do correlograma para cada uma das subpopulações pode indicar o distanciamento mínimo onde torna-se mais provável amostrar indivíduos menos semelhantes geneticamente, que é uma importante informação para o manejo das subpopulações da espécie *T. papyrus*.
- Com base nos dados genéticos obtidos ficou evidente que as três subpopulações da espécie *T. papyrus* devem ser conservadas, pois cada uma contém uma quantidade de variabilidade genética única que não é compartilhada entre elas. Sendo assim, teoricamente torna-se possível a manutenção do potencial evolutivo da espécie e evita a extinção local nas três únicas regiões de ocorrência natural da espécie.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, R. J. V.; Kolbek, J. Can campo rupestre vegetation be floristically delimited based on vascular plant genera? *Plant Ecology*, v. 207, p. 67–79, 2010.

Angers, B.; Bernatchez, L. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology Evolution*, v. 14, p. 230-238, 1997.

Avise, J. C.; Hamrick, J. L. Conservation genetics: case histories from nature. Chapman & Hall, New York, 1996.

Avise, J. C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000, 958 p.

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

Bittencourt, J. V. M.; Sebbenn, A. M. Pollen movement within a continuous forest of wind pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. *Conservation Genetics*, v. 9, p. 855-868, 2008.

Bizoux, J. P.; Daïnou, K.; Bourland, N.; Hardy, O. J.; Heuertz, M.; Mahy, G.; Doucet, J. L. Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree. *Molecular Ecology*, v. 18, p. 4398-4408, 2009.

Born, C.; Hardy, O. J.; Chevallier, M. H.; Ossari, S.; Attéké, C.; Wickings, E. J.; Hossaert-Mckey, M. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Molecular Ecology*, v. 17, p. 2041-2050. 2008.

- Brondani, C.; Rangel, P. H. N.; Borba, T. C. O.; Brondani, R. P. V. Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. *Hereditas*, v. 138, p. 187-192, 2003.
- Brown, J. H.; Lomolino, M. V. *Biogeografia 2ª Edição*. Ed. FUNPEC, 691 p., 2006.
- Burczyk, J.; Koralewski, T. E. Parentage versus two-generation analyses for estimating pollen-mediated gene flow in plant populations. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 8, p. 2525-2537, 2005.
- Cascante, A.; Quesada, M.; Lobo, J. J.; Fuchs, E. A. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, v. 16, p. 137-147, 2002.
- Castro, T. G.; Telles, M.P.C.; Collevatti, R. G. Filogeografia e distribuição disjunta de *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae): uma espécie endêmica de cerrado rupestre. In: 56º Congresso Nacional De Genética, 56. 2010, Guarujá, 2010. p. 66.
- Cockerham, C. C.; Weir, B. S. Estimation of gene flow from *F-statistics*. *Evolution*, v. 47, n. 3, p. 855-863, 1993.
- Collevatti, R. G.; Brondani, R. V.; Grattapaglia, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, v. 83, p. 748-756, 1999.
- Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D.; Hay, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, v. 10, p. 349-356, 2001.
- 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.

Crandall, K. A.; Bininda-Emonds, O. R. P.; Mace, G. M.; Wayne, R. K. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecology and Evolution*, v. 15, p. 290-295. 2000.

Creste, S.; Tulmann-Neto, A.; Figueira, A.; Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, p. 299-306, 2001.

Crozier, R. H.; Kaufmann, B; Carew, M. E.; Crozier, Y. C. Mutability of microsatellites developed for the ant *Camponotus consobrinus*. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 271-276, 1999.

Desalle, R.; Amato, G. The Expansion Of Conservation Genetics. *Nature Review Genetics*, v. 5, p. 702-712, 2004.

Diniz-Filho, J. A. F.; Telles, M. P. C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. *Conservation Biology*, v. 16, n. 4, p. 924-935, 2002.

Diniz-Filho, J. A. F.; Carvalho, A. R.; M. P. Pinto; Anacleto, T. C. Métodos para seleção de reservas e estabelecimento de áreas prioritárias para conservação no Cerrado. *In: Recursos Genéticos e Conservação de Plantas Medicinais do Cerrado*. Pereira AMS (Ed). Editora Legis Summa. Ribeirão Preto. FAPESP, p. 75-107, 2007.

Diniz-Filho, J. A. F.; Telles, M. P. C., Bonatto, S. L.; Eizirik, E.; Freitas, T. R. O.; Marco, P.; Santos, F. R.; Solé-Cava, A.; Soares, T. N. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography*, v. 35, p. 753-763, 2008.

Doligez, A.; Joly, H. I. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. *Heredity*, v. 79, p. 72-82, 1997.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, v. 19, p.11-15, 1987.

Eckert, C. G.; Samis, K. E.; Loughheed, S. C. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 5, p. 1170-1188, 2008.

Ellegren, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, v. 16, n. 12, p. 551-558, 2000.

Ellegren, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p. 435-445, 2004.

Epperson, B. K.; Alvarez-Buylla, E. R. Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. *Evolution*, v. 51, p. 275-282. 1997.

Epperson, B. K. *Geographical genetics*. New Jersey: Princeton University Press, 356p. (Monographs in Population Biology, 38). 2003.

Fenster, C. B.; Vekemans, X.; Hardy, O. J. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *Evolution*, v. 57, p. 995-1007, 2003.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 220 p.

Frankham, R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D. A. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto, SP: SBG – Sociedade Brasileira de Genética, p. 280, 2008.

Frankham, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, v. 143, p. 1919-1927, 2010.

Geburek, T.; Konrad, H. Why the Conservation of Forest Genetic Resources Has Not Worked. *Conservation Biology*, v. 22, n. 2, p. 267-274, 2008.

Fundação Biodiversitas. Lista da flora brasileira ameaçada de extinção segundo avaliação no workshop da Fundação Biodiversitas em 2005. 2005. Disponível em: <[http://www.biodiversitas.org.br/florabr/lista\\_florabr.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/florabr/lista_florabr.pdf)>. Acesso em: 15 de dezembro 2010.

Goldstein, B. D.; Schlötterer, C. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, UK, 2001.

Gonçalves, A. C.; Reis, C. A. F.; Vieira, F. A.; Carvalho, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 33, n. 2, p. 325-332, 2010.

Goudet, J.; Raymond, M. Testing differentiation in diploid population. *Genetics*, v.144, p.1933-1940, 1996.

Goudet, J. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices: Version 2.9.3.2. 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>> Acesso em: maio de 2010.

Guia, A. P. O.; Saitoh, T. The gap between the concept and definitions in the Evolutionarily Significant Unit: the need to integrate neutral genetic variation and adaptive variation. *Ecology Research*, v. 22, p. 604-612. 2007.

Hardy, O. J.; Vekemans, X. Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, v. 2, p. 618-620. 2002.

Hardy, O. J. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 1577-1588, 2003a.

Hardy, O. J.; Charbonnel, N.; Fréville, H.; Heuertz, M. Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics*, v. 163, p. 1467-1482, 2003b.

Hardy, J. O.; Maggia, L.; Bandou, E.; Breyne, P.; Caron, H.; Chevallier, M. H.; Doligez, A.; Dutech, C.; Kremer, A.; Latouche-Hallé, C.; Troispoux, V.; Veron, V.; Degen, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 559–571, 2006.

Harr, B.; Schlötterer, C. Long alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide underrepresentation. *Genetics Society of America*, v. 155, p. 1213-1220, 2000.

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

Horn, H. S.; Nathan, R.; Kaplan, S. R. Long-distance dispersal of tree seeds by wind. *Ecological Research*, v. 16, p. 877-885, 2001.

IUCN. 2001. The IUCN Red List of Endangered Species: categories and criteria (versão 3.1). Disponível em: <[http://www.redlist/info/categories\\_criteria2001.html](http://www.redlist/info/categories_criteria2001.html)> Acesso em: 25 de novembro 2010.

Jones, F. A.; Hubbell, S. P. Demographic spatial genetic structure of the Neotropical tree, *Jacaranda copaia*. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 3205-3217, 2006.

Kalisz, S.; Nason, J. D.; Hanzawa, F. M.; Tonsor, S. T. Spatial Population Genetic Structure In *Trillium Grandiflorum*: The Roles Of Dispersal, Mating, History, and Selection. *Evolution*, v. 55, n. 8, p. 1560–1568, 2001.

Klink, C. A.; Machado, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

Legendre, P. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? *Ecology*, v. 74, n. 6, p. 1659-1673. 1993.

Lemes, M. R.; Gribel, R.; Proctor, J.; Grattapaglia, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: Implications for conservation. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 2875-2883, 2003.

Lewis, P. O.; Zaykin, D. Genetic Data Analyses (GDA). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>> Acesso em: maio de 2010.

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, p. 1420-1425, 1995.

Loveless, M. D.; Hamrick, J. L. Ecological Determinants of Genetic Structure In Plant Populations. *Annual Review of Ecology And Systematics*, v. 15, p. 65-95, 1984.

Loveless, M. D.; Hamrick, J. L.; Foster, R. B. Population Structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity*, v. 81, p. 134-143, 1998.

Marinho-Filho, J.; Machado, R. B.; Henriques, R. P. B. Evolução Do Conhecimento E Da Conservação Do Cerrado Brasileiro. In: Diniz, I. R.; Marinho Filho, J.; Machando, R. B.; Cavalcanti, R. B. Cerrado: conhecimento quantitativo como subsídio para as ações de conservação. Brasília: Thesaurus, p.15-31, 2010.

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

MMA. 2000. A Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB. Biodiversidade 1:32.



Montoro, G. R.; Santos, L. S.; Fenologia e Biologia Reprodutiva de *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae) no Parque Estadual da Serra dos Pirineus, Goiás. *Revista de Biologia Neotropical*, v. 4, n. 1, p. 21-29, 2007.

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

Moritz, C. Defining “evolutionarily significant units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 9, p. 373-375. 1994.

Ndiade-Bourobou, D.; Hardy, O. J.; Favreau, B.; Moussavou, H.; Nzengue, E.; Mignot, A.; Bouvet, J.-M. Long-distance seed and pollen dispersal inferred from spatial genetic structure in the very low density rainforest tree, *Baillonella toxisperma* Pierre, in Central Africa. *Molecular Ecology*, v. 19, p. 4949-4962, 2010.

Nei, M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, v. 106, p. 283–292, 1972.

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

Nei, M.. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small 174 number of individual. *Genetics*, v. 89, p. 583-590, 1978.

Newton, A. C.; Allnutt, T. R.; Gillies, A. C. M.; Lowe, A. J.; Ennos, R. A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 14, p. 140-145, 1999.

Oddou-Muratorio, S.; Houot, M.-L.; Demesure-Musch, B.; Austerlitz, F. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 3427–3439, 2003.

Ohta, T.; Kimura, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Resources*, v. 22, p. 201-204, 1973.

Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Venvovsky, R.; Vieira, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology Resources*, v. 4, p. 347-354, 1995.

Primack, R. B.; Rodrigues, E. *Biologia da conservação*. Londrina: E. Rodrigues, 328 p., 2001.

Ratter, J. A.; Bridgewater, S.; Ribeiro, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation: Comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany*, v. 60, p. 57-109, 2003.

Ribeiro, J. F.; Walter, B. M. T. As principais fitofisionomias do Cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P.; Ribeiro, J. F. *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 2, p. 153-199, 2008.

Rizzo, J. A. *Flora do Estado de Goiás e Tocantins*. Plano de Coleção. Coleção Rizzo. Ed. UFG. Volume 1. 1981.

Robinson, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa: Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, p. 329-380. 1998.

Rossi, A. A. B.; Oliveira, L. O.; Venturini, B. A.; Silva, R. B. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genetica*, v. 136, p. 57-67, 2009.

Rousset, F. Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 13, p. 58-62. 2000.

Ryder, O. A. Species Conservation and Systematics: the Dilemma of Subspecies. *Tree*, v. 1 n. 1, p.9. 1986.

Slatkin, M. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 16, p. 393-430, 1985.

Slatkin, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v.139, p. 457-462, 1995.

Smouse, P. E.; Peakall, R.. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, v. 82, p. 561-573, 1999.

Smouse, P. E.; Dyer, R. J.; Westfall, R. D.; Sork, V. L. Two-Generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution*, v. 55, n. 2, p. 260-271, 2001.

Smouse, P. E., Sork, V. L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecology and Management*, v. 197, p. 21-38, 2004.

Soares, T. N. Estrutura genética populacional e fluxo gênico em *Dipteryx alata* vogel (Fabaceae) no cerrado. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

Teixeira, A. H. Árvore do papel *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo. In: 20º Congresso Nacional De Botânica, Goiânia, p. 139-147, 1969.

Telles, M. P. C.; Peixoto, F. P.; Lima, J. S.; Resende, L. V.; Brondani, R. P. V.; Walter, M. E. M. T.; Collevatti, R. G. Development of Microsatellite Markers for the Neotropical

Endangered Tree Species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). *Genetics and Molecular Research*, v. 10, n.1, p. 321-325. 2010.

Valdes, A. M.; Slatkin, M.; Freimer, N. B. Allele Frequencies at Microsatellite Loci: The Stepwise Mutation Model Revisited. *Genetics*, v.133, p. 737-749, 1993.

Van Oppen, M. J. H.; Rico, C.; Turner, G. F.; Hewitt, G. M. Extensive Homoplasy, Nonstepwise Mutations, and Shared Ancestral Polymorphism at a Complex Microsatellite Locus in Lake Malawi Cichlids. *Molecular Biology and Evolution*, v. 17, n. 4, p. 489-498, 2000.

Vekemans, X.; Hardy, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 921–935. 2004.

Wagner, H. W.; Sefc K. M. Identity 1.0. Vienna: Centre for Applied Genetics. University of Agricultural Sciences, 1999.

Waples, R. S. Pacific Salmon, *Oncorhynchus* spp., and the Definition of "Species" Under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review*, v. 53, n. 3, p. 11-22, 1991.

Ward, M.; Dick, C. W.; Gribel, R.; Lowe, A. J. To self, or not to selfy... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, v. 95, p. 246-254, 2005.

Weber, J. L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT) polymorphisms. *Genomics*, v. 7, p. 524-530, 1990.

Weir, B. S.; Cockerham C. C. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution Resources*, v. 38, p.1358–1370, 1984.

Weir, B. S.; Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates Inc, 192 p., 1996.

Wright, S. Isolation by distance. *Genetics*, v. 28, p. 114-38, 1943.

Wright, S. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*, v. 31, p. 39-59. 1946.

Wright, S. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, v. 15, p. 323-354, 1951.

Wright, J. M.; Bentzen, P. Microsatellites: genetic markers of the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 4, p. 384-388, 1994.

Zucchi, M. I.; Brondani, R. P. V.; Pinheiro, J. B.; Chaves, L. J.; Coelho, A. S. G.; Vencovsky, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

## 10. APÊNDICES

### 9.1 *Extração de DNA Vegetal*

1. Primeiro verifique se todas as soluções estão preparadas. Ligue o banho-maria a 65°C. Prepare três conjuntos idênticos de tubos devidamente numerados. Anote na ata de laboratório a correspondência entre os números nos tubos e a identificação das amostras.
2. Para cada extração serão utilizados 1ml de tampão de extração. Calcule a quantidade total necessária de tampão de extração multiplicando o número de amostras + 1 (para segurança) por 1ml. Adicione 2-mercapto-etanol à quantidade necessária de tampão, na proporção de 5µl de 2-mercapto-etanol para cada mililitro de tampão de extração. Mantenha o tampão de extração aquecido em banho-maria a 65°C.
3. Pese 50 a 200 mg de tecido fresco para cada amostra diretamente dentro do tubo. Quantidades em torno de 150 mg são geralmente ideais. Se estiver utilizando folhas, corte-as em tiras de aproximadamente 3 a 5 mm de largura. Disponha as tiras de tecidos dentro do tubo verticalmente de maneira a permitir a maceração do tecido contra as paredes do tubo.
4. Adicione nitrogênio líquido em quantidade suficiente para encher o tubo. Espere até que o nitrogênio líquido tenha baixado (20 a 30 segundos), pois assim, o tecido estará bem congelado antes de iniciar a maceração.
5. Macere rapidamente por uns 20 a 40 segundos até o tecido se mostrar bem pulverizado. Ao tecido recém macerado adicione 1ml de tampão de extração. Ressuspenda o tecido no tampão com o auxílio de um vórtex para homogeneizar bem (se não homogeneizar use um palito de dente).
6. Incube os tubos em banho-maria a uma temperatura de 65°C por um mínimo de 30 minutos. Durante a incubação, agite os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar. Retire os tubos do banho-maria. Deixe-os chegar à temperatura ambiente.

7. Em capela de exaustão, faça a primeira extração com solvente orgânico adicionando 600  $\mu\text{l}$  de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). Agite os tubos no vórtex e depois invertendo-os durante 5 minutos (no mínimo 20 vezes) ou até fazer uma emulsão homogênea.
8. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima (14000 rpm) durante 5 minutos.
9. Retire cuidadosamente os tubos da centrífuga, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas. Pipete a fase superior (aquosa) para um novo tubo. Para acelerar esta operação regule a pipeta para 180  $\mu\text{l}$  e retire 3 alíquotas ( $\sim 540 \mu\text{l}$ ) fixas. À fase aquosa no novo tubo adicione 1/10 do volume ( $\sim 50 \mu\text{l}$ ) de uma solução de CTAB 10%, 1,4 M NaCl (solução bastante viscosa). Agite no vórtex e misture bem durante 5 minutos até homogeneizar a solução. Repita a extração com 600  $\mu\text{l}$  de CIA (passo 7). Retire novamente a fase aquosa superior e transfira-a para um novo tubo.
10. Adicione 2/3 do volume da solução aquosa ( $\sim 400 \mu\text{l}$ ) de isopropanol frio ( $-20^\circ\text{C}$ ). Misture calmamente para precipitar os ácidos nucleicos. Leve o tubo a  $-20^\circ\text{C}$  por no mínimo 30 minutos.

*Precipitação:*

1. Centrifugue os tubos a 6000 a 7500 rpm em microcentrífuga durante 3 a 5 minutos, para formar um pellet.
2. Com cuidado derrame o máximo possível de sobrenadante sem perder o pellet\*
3. Lave o pellet duas vezes em 1 ml de etanol 70%. Deixe o pellet imerso por 5 a 10 minutos cada vez. Retire o etanol.
4. Lave o pellet uma vez em 1 ml de etanol 95% (ou absoluto) durante 2 a 3 minutos. Retire o máximo possível do etanol, deixando secar bem.

5. Ressuspenda o pellet em 50 µl ou 100 µl de T.E. 1 X.

*\*Se nesta fase o pellet se apresentar grande demais, viscoso e amarelado, é provável que outras substâncias estejam agregadas, como polissacarídeos, por exemplo. É aconselhável “lavar” o pellet com NaCl. Primeiro lave uma vez com etanol 95% retire o etanol, deixe secar e depois adicione 500 µl de NaCl 2M e levar as amostras ao Banho Maria à 65° C por 10 a 15 minutos. Leve ao Freezer, centrifugue à 6000 a 7500 rpm por 3 a 5 minutos, nesta fase o que não entrar em solução consiste em contaminante indesejável. Repita os passos 11 a 4 - no passo N° 3 costumamos lavar apenas uma vez nesta fase- ressuspenda o pellet (passo5).*

## **9.2 Protocolo para coloração com nitrato de prata de fragmentos separados em gel de poliacrilamida (CRESTE et al., 2001).**

<b>Procedimento/ Solução</b>	<b>Tempo</b>
Fixação (Etanol 10%, ácido acético 1%)	10 minutos
Lavagem (Água destilada)	1 minuto
Pré tratamento (Ácido nítrico 1,5%)	3 minutos
Lavagem (Água destilada)	1 minuto
Impregnação (Nitrato de Prata 0,2%)	20 minutos
Lavagem (Água destilada)	30 segundos
Lavagem (Água destilada)	30 segundos
Revelação* (30g de NaCO <sub>3</sub> /1L	4-7 minutos
Bloqueio (Ácido acético 5%)	5 minutos
Lavagem (Água destilada)	1 minuto

\* Solução deve ser utilizada resfriada (12 °C) e deve-se acrescentar 0,54mL de formaldeído (37%) na hora do uso. Utilizar apenas metade da solução até que a mesma fique escura, quando pode ser colocada o restante da solução