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

Aspectos da demografia do cajueiro-do-campo (*Anacardium humile*) em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo e construção de bibliotecas enriquecidas de microssatélites para a espécie

Carolina Grando

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2009**

Carolina Grando
Engenheiro Agrônomo

Aspectos da demografia do cajueiro-do-campo (*Anacardium humile*) em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo e construção de bibliotecas enriquecidas de microssatélites para a espécie

Orientador:
Prof. Dr. GIANCARLO CONDE XAVIER OLIVEIRA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2009

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

Grando, Carolina

Aspectos da demografia do cajueiro-do-campo (*Anacardium humile*) em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo e construção de bibliotecas enriquecidas de microsatélites para a espécie / Carolina Grando. - - Piracicaba, 2009.
76 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Caju - Distribuição 2. Cerrado 3. Marcador molecular I. Título

CDD 634.573
G754a

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

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para que meu trabalho fosse possível:

Ao Departamento de Genética pela estrutura e liberação do carro para as viagens, e a todos os professores e funcionários pelos ensinamentos e convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira pela orientação, liberdade, confiança e ensinamentos durante todo o percurso

À Prof. Dra. Samantha Koehler, da Universidade Federal de São Paulo, pelo uso de equipamentos e reagentes de laboratório, além dos preciosos conselhos

Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro do Departamento de Genética da ESALQ, e à pesquisadora Dra. do IAC, Maria Imaculada Zucchi, pela utilização do laboratório e disponibilização de recursos, sem os quais a construção da biblioteca genômica enriquecida de microssatélites seria inviável

À Dra. Mariza Monteiro, pelo companheirismo, pela paciência em todas as etapas da construção da biblioteca genômica enriquecida de microssatélites.

Ao Dr. Marcelo Mattos Cavalari, pela ajuda com o protocolo de extração de DNA (o único que deu certo)

A todos os pós-graduandos do Departamento de Genética que me ajudaram com a parte de laboratório: Filipe Damiani Sávio na construção da biblioteca; Miklos Bajay e Helen Alves Penha no desenho dos *primers*, Milene Möller, Thiaguinho, Miklos Bajay, Carlos Eduardo de Araujo Batista, Fátima Bosetti e Vitor, pela preciosa ajuda com os géis de acrilamida

À Valéria Cristina Rodrigues, Frederico M.C.Vieira e Fernando Ângelo Piotto, pela ajuda nas análises, e à Sheila Tavares Nascimento, pela tradução do resumo

Aos meus companheiros de lab: Jucelene Fernandes Rodrigues, Fernando Ângelo Piotto, Mariana Novello, Gabriele Valadão, Samantha Koeller e Carlos Alberto Veríssimo, por sempre me ajudarem no laboratório e nas minhas análises, e por proporcionarem ótimos momentos de convivência.

Ao Instituto Florestal de Itirapina, em especial à Izabel, pelas acomodações no alojamento

Ao biólogo Fabio Eduardo Matheus, responsável pela área de cerrado da Fazenda Conquista, pela licença de trabalho na área

Aos professores Fernando Martins, Tamashiro e Flavio Antonio Maës dos Santos, da Unicamp, por terem me aceitado como aluna especial da disciplina Ecologia de Campo II

A todos aqueles que me ajudaram nas coletas de campo: Carmo, Jucelene, Ester, Fred, Fátima, Ronaldo, Fernanda, Canjão e especialmente o Capela (esse é o cara!), por terem tornado meu trabalho possível e muito mais agradável

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Genética, Neusa e Fernando, pelos agendamentos das viagens.

Aos meus amigos do curso de pós-graduação, em especial Berenice Kusumoto de Alcântara, Maria Cecília Perantoni Fucks, Milena Moura de Araujo, Lidinalva Resende Gomes, Aliandra Graña de Medeiros, pela ajuda nas disciplinas e pelos momentos de descontração

Aos meus amigos “Bravíssimos”, que sempre me incentivaram ao final da graduação, proporcionando ótimas experiências de vida e momentos inesquecíveis

Aos meus amigos do Coral Luiz de Queiroz e do Grupo Vocal, pelos momentos de cantoria e por todo o carinho

Aos meus companheiros de república, Robson Luis Natis e Ester Holcman, pela amizade e convivência, já me desculpando pela ausência

Às agregadas lá de casa, com quem eu compartilho muito mais do que as chaves: Valéria Cristina Rodrigues, Jerusha Mattos Câmara e Fernanda

Ao Chicão, meu menino preeeeeto, pelo amor incondicional e pela descontração.

A Zaíra, por aquele telefonema que me convenceu de prestar a prova da pós, quando estava mal e já havia desistido

Ao Fred, meu namorado, cuja ajuda foi fundamental ao final da graduação e durante a pós. É o companheiro de todos os campos da minha vida!

À toda minha família de Charqueada e Cerquilho, pela força e torcida

À minha Dona Mãe, Patricia, por todo o suporte emocional e confiança nos meus passos, sempre me apoiando nos momentos de falta de dinheiro e, principalmente, nas minhas decisões. Ela é meu exemplo e o grande amor da minha vida!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 O Cerrado Brasileiro	19
2.2 <i>Anacardium humile</i> A St. Hil.	21
2.3 Padrão de Distribuição Espacial de Populações	26
2.5 Marcadores Microsatélites	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Aspectos da demografia de <i>A. humile</i>	37
3.1.1 Locais de Pesquisa	37
3.1.2 Análises demográficas	37
3.2 Desenvolvimento de marcadores microsatélites	41
3.2.1 Material Vegetal	41
3.2.2 Extração e quantificação de DNA genômico de <i>Anacardium humile</i>	41
3.2.3 Construção de biblioteca genômica enriquecida com microsatélites	42
4 RESULTADOS	51
4.1 Aspectos da demografia de <i>Anacardium humile</i>	51
4.2 Desenvolvimento de microsatélites	53
5 DISCUSSÃO	61
4.1 Aspectos da demografia de <i>Anacardium humile</i>	61
4.2 Desenvolvimento de microsatélites	64
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71

RESUMO

Aspectos da demografia do cajueiro-do-campo (*Anacardium humile* A St. Hill) em áreas de cerrado do Estado de São Paulo e construção de biblioteca genômica enriquecida de microssatélites para a espécie

O cerrado brasileiro é um dos biomas de maior riqueza e endemismo de plantas, mas com alto índice de desmatamento nas últimas décadas, o que resultou na fragmentação dos habitats e na ameaça de extinção de centenas de espécies vegetais. Dentre estas espécies ameaçadas está *Anacardium humile*, conhecida como cajuzinho-do-campo, uma planta caméfito de ampla distribuição pelo país, servindo de alimento para o homem e para alguns animais e apresentando propriedades medicinais. Estudos sobre a estrutura de populações de *Anacardium humile* são escassos na literatura, e seu entendimento é fundamental para a preservação e conservação da espécie. Dessa forma, o presente trabalho teve dois objetivos: 1) em duas fitofisionomias de cerrado distintas, estimar a abundância de *ramets* da espécie, seu padrão de distribuição espacial em macro e microescala, e a influência da porcentagem de abertura do dossel na determinação deste padrão; 2) a construção de uma biblioteca genômica enriquecida de microssatélites para a espécie e o desenho de *primers* a partir desta biblioteca, a fim de isolar locos com potencial para uso como marcadores genéticos. Com relação ao primeiro objetivo, três parcelas de 0,5 ha, divididas em 200 subparcelas, foram instaladas (duas num fragmento de cerrado típico à cerradão e uma num fragmento de cerrado aberto), e todos os *ramets* da espécie foram amostrados por contagem, sendo discriminados os com e sem ataque de *Contarinia sp.* (Diptera: Cecidomyiidae). Fotografias foram tiradas do centro de cada parcela para determinar a porcentagem de abertura do dossel. A abundância de *ramets* foi maior nas áreas mais abertas, mas a incidência de ataque de *Contarinia sp* foi maior no fragmento mais fechado. As análises de macroescala (Índice de Dispersão) e de microescala (Autocorrelação Espacial) mostraram que os *ramets* da espécie apresentam padrão agregado em ambas as áreas, mas que essa agregação, em microescala, não está relacionada à porcentagem de abertura do dossel, embora haja diferenças significativas para este último fator entre os *grids*, indicando que o padrão é devido à sua forma de vida. Já em relação ao segundo objetivo, a construção da biblioteca genômica enriquecida de microssatélites resultou em 180 clones, dos quais 84 foram sequenciados, sendo detectadas 23 sequências contendo microssatélites, o que representa um enriquecimento da biblioteca de 27,38%. Foram desenhados 15 pares de *primers* dentre os 34 microssatélites obtidos, mas apenas 7 pares amplificaram. Destes, cinco pares foram visualizados em acrilamida, e um loco polimórfico foi observado. O número de clones obtidos está dentro do observado em estudos com outras espécies da família Anacardiaceae, mostrando a eficiência do protocolo. Problemas com a otimização de reagentes podem ter impedido a amplificação de alguns *primers*, uma vez que os procedimentos para o desenho dos mesmos foram adequados. Os resultados de polimorfismo são preliminares, devido ao número baixo de indivíduos avaliados. Ao menos um loco apresenta potencial como marcador genético.

Palavras-chave: *Anacardium humile*; Demografia; Microssatélites, Cerrado, Padrão espacial

ABSTRACT

Demographic aspects of cajueiro-do-campo (*Anacardium humile* A St. Hill) in cerrado areas at the State of São Paulo and the construction of the genomic enriched library of microsatellites

Brazilian cerrado is one of the richest and plants endemism biomes, but with a high deforestation in the last decades, resulted in habitats fragmentation and extinction threat of hundreds of plant species. Among these threatened species is *Anacardium humile*, known as cajuzinho-do-campo, a camephyth plant with a wide distribution through the country, which serves as aliment to man and some animals and presents some medical properties. Studies about *Anacardium humile*'s populations structure are very scarce in the literature, and its understanding is fundamental to the preservation and conservation of the species. Thus, the present work had two objectives: 1) in two distincts cerrado plant physiognomies, estimate the abundance of species *ramets*, its spatial distribution pattern in macro and microscale, and the influence of canopy openness percentage in the determination of this pattern; 2) construction of a genomic enriched library with microsatellites to the species and primers design from this library, to isolate loci with potential to be used as genetic markers. In relation to the first objective, three 0,5 ha quadrats, divided in 200 contiguous quadrats of 25 m², were installed (two in a typical cerrado to cerradão fragment and one in an open cerrado fragment), and all species *ramets* were sampled by count, being differentiated in with and without *Contarinia sp* attack ((Diptera: Cecidomyiidae). Photographies of the center of each parcel were taken to determinate the percentage of canopy's openness. The abundance of ramets were higher in the most opened areas, but the incidence of *Contarinia sp* attack were higher in the closest fragment. Macroscale (Dispersion Index) and microscale analysis (Spatial Autocorrelation) showed that species ramets present an aggregated pattern in both areas, but this aggregation is not related to the percentage of canopy's openness, although there are significant differences to this last factor among the grids, indicating that pattern is due to its way of life. In relation to the second objective, the construction of genomic library enriched with microsatellites resulted in 180 clones, which 84 were sequenced, being detected 23 sequences containing microsatellites, representing a library's enrichment of 27,38%. 15 primers pairs were designed among the 34 obtained microsatellites, but only 7 pairs amplified. From these, five pairs were visualized in acrylamide, and one polymorphic loco was observed. The number of obtained clones is in accordance with the observed in studies with another species from Anacardiaceae family, showing protocol's efficiency. Problems with the optimization of reagents may have impeded the amplification of some primers, once that procedures to their design were suitable. Polymorphism results are preliminaries, due to low number of evaluated individuals. At least one loco presents potential as genetic marker.

Keywords: *Anacardium humile*; Demography; Microsatellites, Cerrado, Spatial Pattern

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – (a) distribuição dos ramos de *A. humile*, (b) ramo de *A. humile* apresentando inflorescência na forma de panícula. Área de Cerrado da Fazenda Conquista, Itirapina, SP.....24
- Figura 2 – Três formas de dispersão espacial de pontos. Adaptado de Krebs (1999).....28
- Figura 3 – Folha apresentando ataque de *Contarinia sp* no fragmento de cerrado Estrela, em Itirapina, SP.....29
- Figura 4 – Construção de biblioteca genômica enriquecida de microssatélites através de hibridização seletiva.....35
- Figura 5 – (a) Imagem de satélite das áreas de estudo em Itirapina, SP: 1) Fazenda Conquista e 2) Estrela; (b) Foto da área da Fazenda Conquista; (c) Foto da área Estrela. Fonte da imagem de satélite: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2009.....38
- Figura 6 – Correlogramas espaciais da abundância de ramos para o *grid* 1: (a) com ataque de *Contarinia sp*, (b) sem ataque e (c) total ramos.....52
- Figura 7 – Correlogramas espaciais da abundância de ramos para o *grid* 3: (a) com ataque de *Contarinia sp*, (b) sem ataque e (c) total ramos.....53
- Figura 8 - Gráfico da análise de Kruskal-Wallis mostrando as diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os três pares de *grids* analisados quanto à porcentagem de abertura do dossel54
- Figura 9 – Regressão linear simples entre a porcentagem de abertura do dossel e a densidade de ramets de *A. humile*, em (a) *grid* 1 [$Y = -5,714 + 0,2766X$; $R^2(\text{ajustado}) = 0,0718$], e em (b) *grid* 3 [$Y = 20,8809 + 0,0396X$; $R^2(\text{ajustado}) = -0,005$].....55
- Figura 10 – Géis de agarose 1% utilizados como controle na extração e na construção da biblioteca de microssatélites de *A. humile*: (a) quantificação de DNA obtido na extração, em que as quatro primeiras bandas, da esquerda para a direita, referem-se ao DNA Lambda de 25, 50, 100 e 150 ng/ μ L, sendo a quinta banda referente ao DNA de *A. humile*, (b) digestão do DNA genômico, (c) pré-amplificação dos fragmentos, (d) purificação dos fragmentos. O *Ladder* utilizado em (b), (c) e (d) é de 100 pb.....56
- Figura 11 – Porcentagens dos microssatélites encontrados em relação ao motivo (a) e em relação à classe (b).....57
- Figura 12 – Exemplo de otimização de temperatura de reassociação do par de *primer*s AHP1E04-

2 em gel de agarose 2%. Das onze temperaturas testadas (Tabela 2), foi escolhida a temperatura de número 9, de 60°C. O *Ladder* utilizado é de 100 pb.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes e condições utilizadas para otimização dos <i>primers</i> de <i>A. humile</i>	49
Tabela 2 – Condições de amplificação em esquema <i>touch-down</i> PCR.....	50
Tabela 3 – Valores do n° <i>ramets</i> , média do n° <i>ramets</i> por grid ($\bar{x}$), variância do n° <i>ramets</i> por grid (s^2), Índice de Dispersão (ID) com seu respectivo qui-quadrado (χ^2), para as plantas com e sem ataque de e para o total de <i>ramets</i> observados nos três grids	51
Tabela 4 – Clones contendo sequências de microssatélites, dos quais foram desenhados <i>primers</i> para <i>A. humile</i> . Motivo, classe e tamanho do fragmento sequenciado (pb)	58
Tabela 5 – Valores de temperatura de reassociação para os <i>primers</i> que apresentaram amplificação positiva na otimização em gel de agarose 2%. Cada par de <i>primer</i> é representado por seu motivo correspondente.....	59
Tabela 6 – Resultados da amplificação dos <i>primers</i> para oito indivíduos de <i>A. humile</i> em gel de acrilamida 7%. Valores, em pb, dos alelos esperados e observados no gel, além da análise genética de cada loco (P para polimórfico, M para monomórfico).....	60

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro apresenta ampla distribuição geográfica e diversidade florística, sendo considerado um bioma de grande importância para o país. Foi classificado por Coutinho (1978) como um complexo vegetacional pela variação de suas fitofisionomias, desde paisagens adensadas até as mais abertas, mostrando também formas intermediárias. Estudos sobre a flora do cerrado ressaltam sua riqueza em biodiversidade, com grande endemismo de espécies vegetais.

Ratter; Ribeiro; Bridgewater (1997) estimaram que o cerrado tenha ocupado pouco menos de 25% do território nacional no início do século XX. No entanto, vem sofrendo drástica redução nas últimas décadas devido à expansão das fronteiras agrícolas, ao aumento das cidades e à construção de rodovias, resultado de frentes de colonização de terras que ocuparam a região nos anos 70 e 80, e reflexo de políticas ambientais que destinaram apenas 2,2% de sua área à proteção (KLINK; MACHADO, 2005). Esta redução trouxe várias consequências negativas ao bioma além da fragmentação da paisagem, como a diminuição da diversidade de espécies animais e vegetais e a extinção de espécies endêmicas em diversas regiões do país, ameaçando a sobrevivência das que restaram.

Muitas plantas arbóreas e arbustivas do cerrado estão incluídas em listas de espécies com risco de extinção; contudo, as espécies herbáceas e subarbustivas são consideradas as mais ameaçadas por estas reduções de habitats. Este componente da vegetação detém a maior riqueza vegetal, com cerca de 3000 a 5000 espécies (CASTRO et al., 1999), e apresenta a maior variação em sua composição de acordo com as condições morfoclimáticas (MANTOVANI; MARTINS, 1993).

Para a conservação e preservação da diversidade biológica de espécies vegetais ameaçadas, uma das medidas necessárias é conhecer a estrutura das populações de plantas existentes nestas áreas de risco. A estrutura populacional diz respeito tanto à estrutura genética das populações quanto à distribuição dos indivíduos no espaço, em diferentes estádios de vida. Estes tipos de estudos são importantes para avaliar padrões e os processos que os geram, auxiliando na determinação da diversidade genética das populações e no estabelecimento de áreas destinadas à preservação (DeSALLE; AMATO, 2004; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

A espécie *Anacardium humile* (Anacardiaceae), popularmente conhecida como cajuzinho-

do-campo, é uma planta perene que faz parte deste componente, encontrando-se amplamente distribuída pelas áreas de cerrado brasileiras. Muitos autores denominam esta espécie como uma “árvore enterrada” no solo, pois apresenta estruturas subterrâneas formadas não só por raízes principais e secundárias, mas também por tronco e ramos. As estruturas arbóreas aéreas, formadas pelas folhas coriáceas, inflorescência terminal, frutos e pseudofrutos, são as partes visíveis da planta, atingindo cerca de 40 cm de altura. É classificada como frutadeira tropical, servindo de alimento para o homem e para alguns animais, como o lobo-guará e a ema. Apesar de seu potencial agrícola e medicinal, está ameaçada de extinção (LÓPEZ-NARANJO, 1975; ALMEIDA et al., 1998).

Estudos sobre a biologia de populações de *Anacardium humile*, referentes tanto à estrutura genética quanto à distribuição dos indivíduos no espaço, são escassos na literatura. Dessa forma, o trabalho se insere entre os pioneiros para a espécie e, por isso, possui um caráter majoritariamente descritivo, pretendendo abordar dois aspectos da estrutura de populações:

i) o padrão de distribuição espacial, que depende de fatores físicos e biológicos e que pode afetar o comportamento de polinizadores e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo das plantas (DALE, 1999);

ii) o desenvolvimento de marcadores microssatélites, muito utilizados em estudos de genética de populações devido ao grande poder de resolução e detecção de polimorfismo (SLATKIN, 1995; ELLEGREN, 2004).

O trabalho de campo foi conduzido em duas áreas de cerrado com fitofisionomias distintas, situadas no município de Itirapina, SP. O objetivo foi descrever a abundância e verificar o padrão de distribuição espacial de ramos independentes à altura do solo (*ramets*) de *A. humile*, uma vez que a identificação dos *genets* ainda não é possível, discriminando também os ramos com e sem ataque de *Contarinia sp.* (Diptera: Cecidomyiidae). Foram adotadas duas escalas de observação: dentro de fragmentos (microescala) e entre as áreas estudadas (macroescala). Entretanto, não se pretendeu limitar os objetivos à descrição, mas também investigar as correlações entre ambiente e o padrão de distribuição, que pudessem servir como hipóteses de explicação da demografia. Com esse intuito, foi testada a hipótese nula da aleatoriedade em ambas as escalas de observação:

1) $H_0: ID \text{ ou } I = 0$ contra a alternativa:

$H_a: ID \text{ ou } I \neq 0$, onde *ID* é o Índice de Dispersão e *I* é o Coeficiente de Autocorrelação

Espacial de Moran, que indicam o padrão espacial (v. Material e Métodos).

Condicionalmente a uma rejeição de H_0 , foi testada então a hipótese:

2) H_0 : ID ou $I < 0$ (padrão uniforme) contra a alternativa

H_a : ID ou $I > 0$ (padrão agregado) pois a pergunta ecológica que pretendíamos fazer era se a distribuição de *A. humile* era dependente da porcentagem de abertura do dossel, uma medida indireta da luminosidade em cada subparcela, ou devida às características de vida da espécie.

À rejeição de H_0 (2), realizou-se a regressão da abundância de ramos x porcentagem de abertura do dossel transformada, testando a hipótese de nulidade:

3) H_0 : $\beta = 0$ (ausência da dependência da abundância de ramos em relação à luminosidade) contra a hipótese alternativa:

H_a : $\beta \neq 0$ (dependência da densidade em relação à luminosidade), em que β é o coeficiente de regressão.

No âmbito genético, o trabalho teve como objetivos a construção da biblioteca enriquecida de microssatélites de *Anacardium humile* e o desenho de *primers* a partir desta biblioteca. Além de possibilitar a genotipagem dos ramos para a identificação dos genets no futuro, o desenvolvimento de microssatélites, em fases posteriores da pesquisa, serão úteis para a análise de elementos da estrutura genética de populações de *A. humile* nos fragmentos de cerrado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Cerrado Brasileiro

O cerrado brasileiro é considerado o segundo maior bioma do país, com área estimada por Ratter; Ribeiro; Bridgewater (1997) em aproximadamente 2.000.000 km² no início do século XX, cerca de 23% do território nacional. Sua distribuição inclui uma área núcleo com onze Estados (Bahia, Goiás, Tocantins, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Piauí, Minas Gerais, São Paulo) mais o Distrito Federal, e áreas disjuntas nos Estados do Pará, Roraima e Paraná.

Como os grandes biomas mundiais, cuja distribuição regional de espécies é determinada pelas condições climáticas (temperatura e precipitação, principalmente) e a distribuição local relacionada às condições de solo e relevo (RICKLEFS, 2003), a vegetação do cerrado é delimitada por fatores climáticos e pedológicos. É considerada uma savana neotropical estacional por apresentar gramíneas entre árvores e arbustos, extratos de vegetação comuns nas savanas africanas, e por estar inserido na zona tropical (temperaturas médias entre 20° e 27°C), com duas estações bem definidas pela pluviosidade (inverno seco, de maio a setembro; e verão chuvoso, de outubro a abril), com médias pluviométricas anuais entre 1200 a 1800 mm. Com relação aos fatores pedológicos, os solos são geralmente profundos, porosos, altamente intemperizados, com baixa fertilidade e pH baixo, sendo os latossolos e neossolos quartzarênicos os de maior ocorrência, representando 60% das áreas (REATTO; MARTINS, 2005). Quanto ao relevo, o cerrado ocupa maciços de planaltos sedimentares e de cimeira, com superfície aplainada e altitudes que variam de 300 a 1700 m (AB' SÁBER, 2003).

Além dos fatores climáticos e edáficos, a distribuição da vegetação do cerrado também é determinada pela ação do fogo, devido à grande quantidade de matéria seca vegetal em relação à sazonalidade das chuvas. É considerado um grande agente de perturbação por ocasionar mudanças na estrutura e na composição florística da vegetação, sendo a magnitude de seu efeito dependente da frequência com que ocorre (SALGADO-LABOURIAU, 2005).

Com apenas 2,2% de sua totalidade protegida pela legislação ambiental em vigor (KLINK; MACHADO, 2005), suas dimensões têm diminuído nas últimas décadas devido às pressões antrópicas pela construção de rodovias, pelo aumento dos perímetros urbanos e, principalmente, pela expansão da fronteira agrícola, através da abertura de áreas destinadas ao

plantio de grandes culturas e ao pastejo (AB' SÁBER, 2003).

Na década de 90, Ratter; Ribeiro; Bridgewater (1997) avaliaram a redução do cerrado brasileiro em 40%, atraindo a atenção do meio científico pelas perdas em riqueza e endemismo de espécies vegetais e animais, bem como do potencial alimentar e medicinal de muitas plantas. Cavassan (2002) também observou a expansão das áreas agrícolas e urbanas no Estado de São Paulo em detrimento das áreas de cerrado. Segundo o autor, 18,2% da superfície do Estado era coberta pelo bioma no início do século XIX, restando atualmente fragmentos isolados que somam 1% da área deste Estado, com possibilidade de extinção nas próximas décadas mediante o aumento das cidades e dos plantios de cana-de-açúcar, eucalipto e de outras culturas.

Outras perdas relacionam-se as fitofisionomias. O cerrado como um todo - *sensu lato* -, foi classificado por Coutinho (1978) como um complexo vegetacional que apresenta variações fisionômico-florísticas de floresta-ecótono-campo, em que se observam duas floras distintas: uma arbustivo-arbórea, de fisionomias florestais, e outra herbáceo-subarbustiva, de áreas campestres, as quais podem ocorrer isoladas, resultando nos cerradões e nos campos limpos respectivamente, ou em conjunto, formando as fisionomias savânicas ou ecótonos, denominados cerrado *sensu stricto*, campo sujo e campo cerrado. Matas de galeria, matas mesófilas e campos úmidos também podem ocorrer, mas em menor frequência (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997).

Quanto à riqueza de espécies vegetais, Castro et al. (1999) estimaram a flora do cerrado entre 3000 a 7000 espécies, sendo 1000 a 2000 espécies arbustivo-arbóreas e 3000 a 5000 espécies herbáceo-subarbustivas, números muito maiores do que outros pesquisadores supunham. Dos dois extratos vegetais, o menos estudado é o extrato herbáceo, apesar da grande riqueza de espécies (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997; CASTRO et al. 1999.); além disso, é o que apresenta maior variação em sua composição florística de acordo com as condições morfoclimáticas, indicando susceptibilidade às mudanças ambientais e às ações antrópicas (MANTOVANI; MARTINS, 1993).

2.2 *Anacardium humile* A St. Hil.

Existem muitas espécies no componente herbáceo-subarbusivo que demandam maiores estudos, dentre as quais *Anacardium humile* A St. Hil. Esta espécie perene é nativa das áreas abertas de cerrado do país – *sensu stricto*, campo sujo, campo limpo e campo cerrado -, que ocorrem com frequência nos Estados da Bahia, Goiás, Tocantins, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. É uma angiosperma da família Anacardiaceae, também conhecida popularmente como cajuí, cajueiro-do-campo ou cajuzinho-do-cerrado. À primeira vista, é uma planta pequena, de até 40 cm de altura, com folhas coriáceas e inflorescência terminal; no entanto, sua forma de vida é caméfito, caracterizando-se por apresentar estruturas arbóreas aéreas com estruturas de vida subterrânea (LÓPEZ-NARANJO, 1975; LÓPEZ-NARANJO; PERNÍIA 1990; ALMEIDA et al., 1998; TANNUS; ASSIS, 2004; LORENZI, 2006).

De acordo com López-Naranjo (1975), o corpo subterrâneo ou hipógeo de *A. humile* é formado pelo sistema de raízes principais e secundárias e pelo sistema caulinar, composto por tronco e ramos. O sistema radicular é composto por uma raiz principal ortotrópica, que se estende até grandes profundidades em busca de água, e pelas raízes secundárias, que emergem da principal no sentido oblíquo a profundidades geralmente superiores a 1,5 - 2,0 m. O tronco apresenta comportamento ortotrópico e crescimento em profundidade, e sua função biológica primária restringe-se ao transporte de substâncias do sistema radicular aos ramos e folhas, uma vez que a função de sustentação foi eliminada pelo suporte que o solo dá à copa da planta. Outra função desempenhada pelo tronco é o armazenamento de água e de amido, o que confere à espécie maior resistência às secas e queimadas.

Segundo o mesmo autor, os ramos subterrâneos partem do tronco e se distribuem no solo de forma simpodial e plagiotrópica. São classificados em eixos vegetativos hipógeos e eixos vegetativos mistos. Os eixos vegetativos hipógeos também atuam como reservatórios de água e amido e são compostos por órgãos plagiótropos simples denominados catafilos, que são folhas modificadas com função de proteção do meristema apical e das gemas axilares. Já os eixos vegetativos mistos têm este nome por conterem catafilos em sua base e, em sua porção terminal, folhas fotossintetizantes que formam os eixos aéreos da planta. Os eixos vegetativos mistos são, na verdade, eixos hipógeos em que houve diferenciação dos meristemas apicais.

O corpo aéreo ou epígeo de *A. humile* é formado das folhas e flores que afloram na superfície do solo, possuindo comportamento ortotrópico e crescimento apical. Originam-se a partir de uma mudança de orientação do crescimento dos eixos vegetativos mistos, em que uma diferenciação do meristema apical inicia o desenvolvimento das folhas, e posteriormente das inflorescências. Essa mudança de orientação é verificada também em plantas submetidas às queimadas, um fenômeno comum em áreas de cerrado, como uma forma de restabelecimento da espécie no ambiente antes mesmo de gramíneas e de outras plantas (LÓPEZ-NARANJO, 1975; LÓPEZ-NARANJO; PERNÍA, 1990).

Com relação às folhas de *A. humile*, estas são alternas simples, sem estípulas, coriáceas, de 10 a 40 cm de comprimento, com pecíolos de 2 a 15 mm de comprimento. A venação é pinada, com a nervura principal desenvolvida e saliente na superfície abaxial, e nervuras laterais arqueadas e ramificadas próximas das margens. Possui filotaxia espiralada e orientação tendendo à vertical, a qual atua como uma cobertura protetora do ápice vegetativo (LÓPEZ-NARANJO, 1975; ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2006).

Os sistemas caulinares e radiculares da espécie não produzem brotos adventícios e vegetativos, constituindo-se em órgãos estéreis. A espécie se propaga por sementes, com germinação hipógea (LÓPEZ-NARANJO, 1975; ALMEIDA et al., 1998; BARROSO et al., 1999; LORENZI, 2006). O embrião, que é carnoso e curvo e não possui endosperma, emite um epicótilo que se alonga e se diferencia como eixo folioso acima da superfície do solo, enquanto raízes, hipocótilo e cotilédones permanecem sob a superfície (LÓPEZ-NARANJO, 1975; CARVALHO; SANTANA; RANAL, 2005).

As sementes de *A. humile* não são dormentes e têm baixa longevidade (ALMEIDA et al., 1998), e, apesar de Lorenzi (1998) ter afirmado que as mesmas possuem baixa capacidade de germinação sem pré-tratamento, Carvalho; Santana e Ranal (2005) encontraram percentuais altos de germinação para a espécie em condições naturais, próximos de 60%. Os autores também constataram que, num mesmo intervalo de tempo, a frequência de plântulas que emergiram foi pequena, indicando que *A. humile* apresenta baixa sincronia de emergência. Segundo eles, isto pode favorecer o estabelecimento da espécie num ambiente adverso como o cerrado, uma vez que, ao espalhar no tempo sua capacidade de gerar plântulas, as sementes não dormentes podem ocupar habitats com maior sucesso.

Com relação ao desenvolvimento de *A. humile* após a emergência, López-Naranjo (1975)

o classifica em três etapas principais. A primeira inicia-se a partir da ramificação dos eixos hipógeos do tronco, seguido do crescimento internodal dos mesmos; a segunda, a partir da mudança de orientação de crescimento dos meristemas apicais, que originarão as folhas; e a terceira, pela formação dos órgãos reprodutivos. Somente após o desenvolvimento completo dos eixos epígeos é que as gemas protegidas pelos catafilos diferenciam-se, produzindo um novo eixo hipógeo, que continua seu crescimento plagiotrópico.

Quanto aos órgãos reprodutivos, a espécie possui uma inflorescência terminal na forma de panícula, contendo os dois sexos. As flores são melíferas (ALMEIDA et al. 1998), perfumadas e polinizadas por abelhas (LORENZI, 2006), sendo *Apis mellifera* a principal espécie, embora Barbosa (1997) tenha classificado que a polinização é realizada por insetos pequenos, que incluem, além de abelhas, pequenos besouros, moscas, vespas e borboletas. Almeida et al. (1998) dividiram as flores em estaminadas (oito a dez estames, com antese diurna) e monoclinas (ovário súpero com um óvulo lateral), sendo que a proporção de ambas nas inflorescências é de 4:1, respectivamente. De acordo com os mesmos autores, esta proporção é uma das razões da baixa produção de frutos por planta, uma vez que, nas flores estaminadas, somente um entre oito a dez estames é fértil. Outras razões são a tendência dos grãos de pólen dos estames permanecerem unidos à antera após a deiscência, e a incapacidade de algumas flores monóclinas se transformarem em fruto (FERRÃO, 1995 *apud* CARVALHO; SANTANA; RANAL, 2005).

Segundo Barroso et al. (1999), o fruto verdadeiro de *A. humile* é uma núcula reniforme, de coloração parda e com pericarpo duro e seco, que contém uma semente de inserção basal que preenche toda a cavidade da núcula. Junto ao fruto, encontra-se o pedúnculo superdesenvolvido, o pseudofruto, que apresenta coloração amarelo-avermelhada, sabor adocicado (LORENZI, 2006) e acidez levemente maior que de *A. occidentale* L. (ALMEIDA et al., 1998). Estas características são atrativas para diversos animais, que ingerem o fruto verdadeiro juntamente com o pseudofruto, promovendo a dispersão da espécie no ambiente. A dispersão zoocórica é realizada principalmente por canídeos silvestres neotropicais nos períodos secos do ano, uma vez que a escassez de água no inverno diminui a disponibilidade de pequenos animais na dieta dos mesmos. Dentre os canídeos silvestres que incluem *A. humile* em sua dieta, estão *Lycalopex vetulus*, a raposa-do-campo, e *Chrysocyon brachiurus*, o lobo-guará (DALPONTE; LIMA, 1999; BUENO; BELENTANI; MOTTA-JUNIOR, 2002).

Os frutos e pseudofrutos também são consumidos por populações humanas próximas das

áreas de ocorrência da espécie, sendo *A. humile* classificada como uma frutadeira tropical. O pseudofruto pode ser consumido *in natura* ou utilizado na confecção de doces e compotas, e o fruto é consumido torrado (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2006).

Figura 1 – (a) distribuição dos ramos de *A. humile*, (b) ramo de *A. humile* apresentando inflorescência na forma de panícula. Área de Cerrado da Fazenda Conquista, Itirapina, SP

Anacardium humile apresenta fases curtas de floração e frutificação (DALPONTE; LIMA, 1999), que coincidem, respectivamente, com o final de períodos secos do ano e início de períodos chuvosos, ao contrário do observado por Batalha e Mantovani (2000) para a maioria das plantas do extrato herbáceo-subarbustivo do cerrado, cujas fases de floração e frutificação concentram-se no final da estação chuvosa. Os períodos de floração da espécie iniciam-se em julho (LORENZI, 2006), concentrando-se nos meses de agosto e setembro (ALMEIDA et al., 1998; DALPONTE; LIMA, 1999; BATALHA; MANTOVANI, 2000; WEISER; GODOY, 2001). Para frutificação, os períodos de amadurecimento dos frutos iniciam-se em agosto, com pico em setembro e término ao final de outubro (ALMEIDA et al., 1998; BATALHA; MANTOVANI, 2000; LORENZI, 2006).

A separação das plantas de *A. humile* no campo pode constituir-se numa tarefa complicada, pois a definição dos limites individuais é difícil de se verificar. A situação é igualmente complexa para outras plantas herbáceas (MORELLATO; LEITÃO-FILHO, 1996

apud GALETTI; PIZO; MORELLATO, 2003). López-Naranjo (1975) afirmou que o crescimento subterrâneo dos caules e ramos de *A. humile* dificulta a separação de indivíduos no campo, sendo possível uma distinção entre plantas pela visualização da área da copa, que mostra contorno aproximadamente circular. O autor mensurou indivíduos que apresentaram áreas de copa de aproximadamente 200m², o que indica que a sobreposição de indivíduos pode ser freqüente.

Carvalho; Santana; Ranal (2005) discorrem sobre a necessidade de estudos de sucesso reprodutivo de espécies como *A. humile*, uma vez que o número pequeno de sementes obtidas por cruzamentos específicos limita os conhecimentos sobre viabilidade da geração F₁. Dessa forma, pesquisas acerca da estrutura genética e do padrão de distribuição espacial da espécie são importantes como estudos iniciais, para geração de hipóteses a respeito de processos ecológicos que influem sobre a geração destes padrões e, ainda, sobre como estes padrões influem sobre sucesso reprodutivo das plantas.

2.3 Padrão de Distribuição Espacial de Populações

Fortin; Dale; Hoef (2002) comentaram que o primeiro passo para se entender os processos ecológicos é a identificação de padrões, dentre eles o padrão espacial. Dale (1999) definiu padrão espacial como o arranjo físico dos indivíduos no ambiente de tal modo que se consegue quantificá-lo com certa previsibilidade, de acordo com a escala de observação. Segundo o autor, este é um aspecto muito importante nas comunidades de plantas, pois, ao descrever e quantificar estes padrões, é possível relacioná-los a processos subjacentes (estabelecimento, crescimento, competição, reprodução, senescência e mortalidade), a fim de formular hipóteses sobre estes processos e sugerir os mecanismos que têm dado origem aos padrões. Krebs (1999) também afirmou que o padrão espacial mostrado por uma espécie no campo pode ser utilizado para estimar sua abundância e para a construção de intervalos de confiança para estas estimativas.

Embora Dale (1999) tenha discutido que os padrões espaciais atualmente encontrados numa comunidade de plantas sejam resultado de processos que ocorreram no passado, ele afirmou que não é possível inferir processos a partir dos padrões, mas sim, testar hipóteses sobre processos passados, mesmo que estes não ofereçam conhecimento completo sobre tudo o que ocorreu em determinada escala de observação.

Além disso, o mesmo autor ressaltou que o padrão espacial em comunidades vegetais interfere em processos futuros tanto das plantas em si como dos animais que interagem com elas, constituindo-se numa parte importante da estrutura do habitat. Doak (1992) *apud* Dale (1999), ao observar as interações entre plantas e animais em fragmentos, comentou que a fragmentação de habitats, o tamanho, isolamento e a densidade dos fragmentos têm efeitos não somente sobre herbívoros, que se alimentam diretamente ou que obtêm seu ambiente físico das plantas, mas sobre seus patógenos e parasitas. Ainda segundo o autor, esta fragmentação do habitat influi sobre o comportamento de polinizadores e de dispersores de propágulos.

Bernacci (2001) discutiu que fatores bióticos e abióticos e a interação entre eles num habitat são responsáveis por determinar o arranjo dos indivíduos de uma população. Dentre os fatores causais que promovem este arranjo estão fatores ambientais (luminosidade, profundidade e teor de nutrientes do solo, intensidade do vento, impedimentos rochosos de subsuperfície, e alguns distúrbios como efeitos do fogo e queda de árvores); fatores morfológicos e reprodutivos das plantas (tamanho e padrão de crescimento das plantas, reprodução clonal ou sexuada); fatores

fitossociológicos (competição intra ou interespecífica por recursos do ambiente, ou interações positivas, em que determinadas plantas proveêm sítios favoráveis ao crescimento de outras espécies); fatores biológicos (ação de patógenos e inimigos naturais, comportamento de polinizadores e de dispersores de propágulos), e fatores estocásticos, decorrentes da variação aleatória dos fatores anteriores (LUDWIG; REINOLDS, 1988; HUTCHINGS, 1997 *apud* COSTA, 2006; DALE, 1999).

Existem três padrões espaciais básicos citados na literatura ecológica: o aleatório, o uniforme ou regular e o agregado (LUDWIG; REINOLDS, 1988; DALE, 1999; BEGON; HARPER; TOWNSEND, 2007). Krebs (1999) afirmou que estes padrões podem ser determinados a partir da seguinte questão: “Dada a localização de um indivíduo, qual é a probabilidade de outro indivíduo estar próximo?”. Se o padrão for aleatório, a probabilidade de um indivíduo ocupar qualquer ponto no espaço é igual, independente da ocorrência de outros. Se o padrão for regular, a probabilidade é reduzida, pois há uma uniformidade de espaçamento entre os indivíduos maior do que o esperado pelo acaso (há uma tendência de um indivíduo em evitar os outros, ou ocorre morte entre indivíduos próximos). Já se o padrão for agregado, a probabilidade é aumentada, pois os indivíduos estão mais próximos entre si do que o esperado pelo acaso (há uma tendência de atração dos indivíduos a certas partes do ambiente ou a outros indivíduos) (KREBS, 1999; BEGON; HARPER; TOWNSEND, 2007).

Dale (1999) ressaltou três aspectos importantes nos estudos sobre padrão espacial de plantas. O primeiro relaciona-se ao objetivo da pesquisa, como, por exemplo, se o padrão espacial se refere a plantas consideradas como pontos no espaço ou ao mosaico de diferentes domínios da vegetação. O segundo aspecto é a escala de observação, que irá influenciar nas técnicas de amostragem e na análise dos dados. Já o terceiro aspecto refere-se ao próprio delineamento amostral escolhido pelo pesquisador, uma vez que a maior parte dos delineamentos tradicionais presentes nos livros de estatística não é recomendável para análise do padrão espacial numa comunidade de plantas (por exemplo, a amostragem aleatória não pode ser indicada quando se deseja verificar se há relação espacial entre as amostras).

Figura 2 – Três formas de dispersão espacial de pontos. Adaptado de Krebs (1999)

2.4 *Contarinia sp.*

É possível observar no cerrado a presença de muitas plantas com ataque de insetos galhadores. Em *A. humile*, Guimarães e Scarcelli-Santos (2006) observaram o ataque do díptero *Contarinia sp.*, da família Cecidomyiidae, um inseto de cerca de 2 a 3 mm de tamanho e que faz sua oviposição em várias espécies de plantas. A folha se modifica com a oviposição, formando uma galha vermelha arredondada, onde fica instalada a larva de cor amarelada. Segundo os autores, os ataques de insetos galhadores são bem comuns, mas pouco estudados.

Figura 3 – Folha apresentando ataque de *Contarinia sp* no fragmento de cerrado Estrela, em Itirapina, SP

2.5 Marcadores Microssatélites

Os marcadores moleculares constituem-se em pontos de referência do cromossomo, nos quais é possível verificar o polimorfismo genético ao nível de DNA. Apresentam, em geral, algumas vantagens em relação aos marcadores morfológicos, como o grande número de locos com alto nível de polimorfismo, a utilização em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas, além de serem praticamente ilimitados em número (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; COLLARD et al., 2005).

Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites correspondem a um dos marcadores de maior uso na atualidade. Também referidos como *short tandem repeats* (STRs) ou *simple sequence repeats* (SSRs), são compostos por unidades repetitivas denominadas motivos, os quais apresentam sequências repetidas de um a seis nucleotídeos repetidos *em tandem*. São classificados com relação ao motivo (mononucleotídeo, dinucleotídeo, trinucleotídeo, tetranucleotídeo, pentanucleotídeo e hexanucleotídeo, quando há, respectivamente, uma, duas, três, quatro, cinco e seis repetições do motivo) e também conforme a composição das sequências repetidas: i) repetições perfeitas, que não apresentam nenhuma interrupção, como por exemplo CACACACACACACA; ii) repetições imperfeitas, interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, como CACACACACAGTCACACACACA; iii) repetições interrompidas, quando há uma sequência de bases dentro da sequência repetida que não pertence ao motivo, como por exemplo CACACACACATGTCACACACACA ; iv) repetições compostas, quando dois ou mais motivos distintos são dispostos adjacentes, como por exemplo CACACACACAGTGTGTGTGT (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ELLEGREN, 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

No genoma, as regiões que apresentam essas sequências repetidas são denominadas locos microssatélites, sendo que cada motivo com determinado número de repetições contido nesse loco refere-se a um alelo. Em cromossomos homólogos, um loco microssatélite pode ser monomórfico, quando ambos os alelos apresentam o mesmo numero de repetições do motivo, ou polimórfico, quando os alelos apresentam número de repetições do motivo distintos. Quando a análise do polimorfismo destes locos é estendida para uma população, é possível observar alguns locos microssatélites altamente polimórficos, que permitem a diferenciação entre indivíduos com alto poder discriminatório (SUGANUMA; CIAMPI; 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

A origem e evolução dos microssatélites no genoma é um processo complexo e bastante pesquisado no meio científico. Oliveira et al. (2006) ressaltaram estudos que apontaram o número de repetições como um dos fatores mais importantes na dinâmica evolutiva dos microssatélites. Isso é verificado pelas altas taxas de mutação observadas nos locos microssatélites se comparadas com outras regiões do genoma, as quais variam de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco em cada geração, alterando o número de repetições por motivo e, dessa forma, gerando polimorfismo em cada loco.

Para explicar estas taxas de mutação, existem duas hipóteses. A principal é o *slippage* ou deslizamento da DNA polimerase, que ocorre durante a replicação do DNA, onde uma das fitas se dissocia momentaneamente da outra, sendo reaneladas posteriormente em posições diferentes, gerando, no próximo ciclo de replicação, cópias com diferentes números de repetições de um determinado motivo, através da inserção ou deleção de uma unidade de repetição. A segunda hipótese é o *crossing-over* desigual, devido ao pareamento não completamente homólogo das unidades repetitivas durante a meiose, o que ocasiona ganhos ou perdas de um grande número de repetições. Esta última hipótese, contudo, vem perdendo força, pois testes para avaliar a correlação entre a taxa de recombinação e a densidade de mutação foram não-significativos (ELLEGEN, 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

Rose e Falush (1998) compararam os números esperados e observados de microssatélites no genoma de leveduras e verificaram que repetições menores que 8 nucleotídeos são menos comuns do que o esperado pelo acaso, o que indicaria o *slippage* como um processo raro abaixo desse limiar. Dessa forma, um número mínimo de repetições (proto-microssatélite) seria necessário para que o *slippage* ocorresse. Em contrapartida, Pupko e Graur (1999), também analisando genoma de leveduras, verificaram que mesmo microssatélites de duas repetições ocorreram com frequência maior que o esperado, sugerindo que não haveria um limiar de número mínimo de repetições para que o *slippage* atuasse, mas sim uma mudança contínua nas taxas de mutação. Visando elucidar os mecanismos de origem de repetições curtas de DNA, Zhu, Strassmann e Queller (2000) analisaram mutações de substituição e inserção em bancos de dados de genoma humano, e constataram um número de mutações por substituição muito superior às mutações por inserção. No entanto, observaram uma porcentagem baixa de mutações por substituição gerando novas repetições, ou seja, as inserções, apesar de raras, são as principais mutações responsáveis pela geração de novas regiões repetitivas curtas, através da duplicação de

sequências adjacentes. Segundo os autores, isto sugere que as mutações por inserção derivam de um processo comum ao *slippage*, o que corrobora os resultados encontrados por Pupko e Graur (1999).

Os microssatélites são encontrados nos genomas de procariotos e eucariotos, com frequência variável mesmo entre espécies relacionadas. No genoma humano, por exemplo, dados de sequenciamento mostraram que cerca de 3% do genoma são compostos por microssatélites, sendo os motivos mais frequentes os dinucleotídeos, seguidos por mono e tetranucleotídeos. Dentre os dinucleotídeos, os motivos (CA)_n predominam, seguidos por (AT)_n, (GA)_n e (GC)_n. Já em ratos, constatou-se a presença de microssatélites de tamanho maior que em humanos, e numa quantidade aproximadamente três vezes maior. Em plantas, cujos genomas apresentam como característica o predomínio do motivo (AT)_n, a frequência de microssatélites é negativamente correlacionada com o tamanho do genoma, fato atribuído à sua baixa representatividade nas regiões do genoma responsáveis pela expansão, como as longas repetições terminais dos retrotransposons (ELLEGREN, 2004).

A neutralidade ou a funcionalidade de um loco microssatélite depende da região do genoma em que ocorre. Oliveira et al. (2006) comentaram que os microssatélites podem ser encontrados em sequências codantes e não codantes do DNA, mas nas primeiras sua densidade é baixa, uma vez que altas taxas de mutação nestas regiões estariam relacionadas à perda de funcionalidade de genes. Dentre os microssatélites que se encontram em regiões não codantes, a maioria apresenta efeitos neutros no genoma, enquanto alguns estão associados com a regulação da expressão gênica, estando situados acima da região de promotor.

Apesar de alguns locos de microssatélites variarem de um indivíduo para o outro, as sequências de DNA que os flanqueiam são bastante conservadas entre indivíduos da mesma espécie, o que proporciona o desenho de *primers* específicos a essas regiões adjacentes. Para cada loco microssatélite são desenhados dois *primers* (um sense e outro antisense), que irão limitar o tamanho do loco na extremidade 5', permitindo que a DNA polimerase inicie o anelamento dos nucleotídeos durante a reação de PCR, replicando o trecho de DNA que contém o microssatélite de interesse.

Como as sequências flanqueadoras dos microssatélites são, em geral, conservadas entre espécies relacionadas, é possível aproveitar os *primers* que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero ou até nas espécies da mesma família, num

processo de amplificação cruzada conhecido como transferibilidade. Estes *primers* são denominados heterólogos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SUGANUMA; CIAMPI; 2005).

O isolamento de locos microssatélites para as espécies que não possuem *primers* desenhados ou nas quais a transferibilidade não é possível pode ser realizado por várias metodologias. Uma delas é o desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas de microssatélites através de hibridização seletiva (Figura 4). O procedimento inicia-se com a restrição do DNA por enzimas, seguido da ligação de adaptadores aos fragmentos obtidos, deixando-os com uma terminação comum que irá permitir sua seleção por PCR. O enriquecimento se dá pela hibridização de sondas conjugadas à biotina que se ligam às regiões de microssatélites dos fragmentos selecionados. Microesferas magnéticas ligadas à estreptavidina são utilizadas para recuperar os fragmentos biotinilados, através de atração magnética numa estante imantada. Os fragmentos enriquecidos são amplificados via PCR e adicionados a um plasmídeo, utilizado para transformar células competentes de *E. coli*. Após a transformação, as colônias que apresentam microssatélites são identificadas e os insertos são amplificados. Posteriormente, as colônias são inoculadas num meio contendo ampicilina para a realização da extração do plasmídeo. Os insertos são selecionados e enviados ao sequenciamento.

Este método apresenta uma porcentagem de clones positivos, ou seja, que contém microssatélites, entre 20 a 90%, enquanto os primeiros métodos de isolamento de DNA mostram valores entre menos de 0,04 a 12%. Assim, este método permite maior sucesso no isolamento de microssatélites em organismos com frequência baixa de regiões repetitivas, como as plantas (BILLOTTE et al., 1999; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

O emprego da tecnologia dos microssatélites envolve algumas limitações, como a grande quantidade de trabalho e o custo para o desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de microssatélites de cada espécie. Apesar de Zane, Bargelloni e Patarnello (2002) terem ressaltado que os avanços tecnológicos na biologia molecular tenham reduzido os custos e facilitado o desenvolvimento dos microssatélites, Squirrell et al. (2003) enumeraram os obstáculos para seu isolamento, desde o sequenciamento de clones da biblioteca genômica até a obtenção de um conjunto de *primers* capazes de amplificar locos polimórficos. Primeiramente, muitos clones enviados ao sequenciamento não apresentam microssatélites ou mostram redundância. A ausência de uma região flanqueadora pela proximidade do microssatélite das extremidades, bem como a

composição de bases desta região (porcentagem de GC baixa), impossibilitam o desenho de alguns *primers*. Ao submeter os *primers* desenhados à validação por PCR, muitos falham na amplificação, ou mostram um padrão de bandas complexo, no qual não é possível a identificação de locos e alelos (problema comum em genomas com DNA repetitivo e em poliplóides). Por fim, muitos *primers* não amplificam microssatélites polimórficos. Segundo os autores, a taxa de atrito média total, do sequenciamento à obtenção de um *primer* que amplifique o microssatélite de interesse, é de aproximadamente 83%, o que mostra o grande esforço dispendido para seu isolamento.

As dificuldades de isolamento de microssatélites e de desenho dos *primers* são superadas pelas vantagens que sua utilização proporciona. Por serem co-dominantes, permitindo que ambos os alelos de um indivíduo heterozigótico possam ser visualizados no gel, multialélicos e amplificados via PCR, a qual torna possível sua detecção mesmo com uma quantidade de DNA bastante reduzida, são amplamente utilizados como marcadores genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SUGANUMA; CIAMPI; 2005).

Ellegren (2004) ressaltou os usos dos marcadores microssatélites para a construção de mapas de ligação, para a análise de caracteres quantitativos, em testes de paternidade e em análise forense, para identificar acessos em programas de conservação de germoplasma e em estudos de genética de populações. Dentro deste último aspecto, Slatkin (1995) afirmou que os microssatélites são os marcadores ideais para os estudos não históricos de genética e evolução de populações naturais por serem os mais informativos, devido ao alto poder discriminatório, à robustez e à confiabilidade. Assim, apresentam grande destaque para a investigação da diversidade genética de populações e de outros processos, como a ocorrência de fluxo gênico e de deriva genética (HEYWOOD; IRIONDO, 2003; OLIVEIRA et al, 2006; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Figura 4 – Construção de biblioteca genômica enriquecida de microsatélites através de hibridização seletiva. Adaptado de Zane; Bargelloni e Patarnello (2002)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos da demografia de *Anacardium humile*

3.1.1 Locais de Pesquisa

As pesquisas sobre o padrão espacial de *Anacardium humile* foram realizadas em duas áreas de cerrado no município de Itirapina, Estado de São Paulo. A ocorrência da espécie foi constatada através de consultas bibliográficas (GIANNOTTI, 1988; BUENO; BELENTANI; MOTTA-JUNIOR, 2002) e visitas aos locais.

Área 1 – Fragmento de cerrado ralo, pertencente a particulares. Situa-se próximo ao fragmento de cerrado denominado Estrela, do Instituto Florestal.

Área 2 – Fragmento de cerrado típico a cerradão de 260 ha, pertencente à Fazenda Conquista.

Situado nas coordenadas 22°15'S e 47°49'O, o município de Itirapina localiza-se numa altitude média de 760 m, recebendo a classificação climática Cwa de Köppen (temperado macrotérmico com inverno seco não rigoroso), com precipitação anual média de 1425 mm (chuvas concentradas de maio a outubro), e temperatura anual média de 19,7°C (DELGADO, 1994 *apud* MIRANDA-MELO, 2007).

O tipo de solo em que se encontram as quatro áreas escolhidas é o Neossolo Quartzarênico (EMBRAPA, 1999).

3.1.2 Análises demográficas

Devido à dificuldade de separação de plantas distintas de *A. humile* no campo, uma vez que a espécie é caméfito e que a sobreposição de ramos subterrâneos entre plantas pode ser freqüente, objetivou-se estimar a abundância e o padrão de distribuição espacial dos ramos independentes à altura do solo. Foram adotadas duas escalas de observação: macroescala, a fim de observar variações de abundância de ramos entre os três fragmentos; e microescala, para

verificar a dispersão dos ramos independentes dentro de fragmentos e, se a agregação se confirmar, verificar o padrão de distribuição dos agregados e a distância média entre eles.

Figura 5 – (a) Imagem de satélite das áreas de estudo em Itirapina, SP: 1) Fazenda Conquista e 2) Estrela; (b) Foto da área da Fazenda Conquista; (c) Foto da área Estrela. Fonte da imagem de satélite: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2009

Foram alocadas duas parcelas de 0,5 ha cada uma na área da Fazenda Conquista e uma parcela na área de cerrado Estrela. Cada parcela de 0,5 ha foi subdividida em 200 sub-parcelas contíguas de 5 x 5 m. As sub-parcelas seguiram o sistema de coordenadas ortogonais (X,Y), nas quais todos os ramos independentes à altura do solo foram amostrados por contagem.

Para análise do padrão espacial em macroescala, ou seja, entre fragmentos, utilizou-se o Índice de Dispersão :

$$I_d = \frac{s^2}{\bar{x}} = \text{variância observada} / \text{média observada}$$

Se as plantas estiverem dispersas aleatoriamente nas parcelas, sua frequência de distribuição se ajusta à distribuição de Poisson, na qual a média é igual à variância. Assim, sob aleatoriedade, o valor do índice de dispersão é igual a 1. Se a dispersão for regular, a variância será menor que a média, e o valor de I_d será menor que 1. Para padrão agregado, a variância será maior que a média, com valor de I_d maior que 1 (Krebs, 1998).

Em microescala, a análise do padrão espacial foi realizada através do Coeficiente de Autocorrelação Espacial de Moran (I). Este coeficiente mede o grau de correlação entre os valores de uma variável em função de diferentes classes de distância (FORTIN; DALE; HOEF, 2002). De acordo com Dale (1999), espera-se que, num *grid* de parcelas contíguas, subparcelas adjacentes serão mais similares em relação às não-adjacentes, sendo que, se há um padrão espacial repetido, a similaridade deve primeiro decrescer conforme o aumento da distância, para depois aumentar novamente. Com isso, é possível obter informações sobre a escala do padrão espacial, que se refere à metade da distância média entre as parcelas mais similares.

Os valores do coeficiente de Moran variam entre +1 (autocorrelação positiva) a -1 (autocorrelação negativa). Há autocorrelação, em ambos os casos, quando é possível prever o valor que uma variável toma em uma dada localidade a partir de valores que a mesma variável toma em outros pontos de amostragem de posições conhecidas (LEGENDRE; FORTIN, 1989). O gráfico entre os valores de I e as classes de distância é chamado de correlograma espacial, e só é considerado significativo se pelo menos um dos valores de I for significativo ao nível de significância $\alpha' = \alpha/n$, onde α é o nível de significância escolhido (0.05) e n é o número de classes de distância consideradas (critério de Bonferroni; ODEN 1984). Valores de I não significativos no correlograma indicam aleatoriedade dos indivíduos. Já valores de I significativos indicam relações entre os indivíduos diferentes do acaso. Assim, se o valor de I for positivo, há uma

tendência de localidades próximas no espaço serem mais similares entre si para o valor da variável, enquanto, para valores negativos de I , localidades próximas tendem a ser mais distintas entre si para o valor da variável (LEGENDRE; FORTIN, 1989).

Fotos retangulares do dossel foram tiradas do centro de cada uma das subparcelas em cada parcela de 0,5 ha, a uma altura de 1,5m do solo, com a máquina WSC Sony, totalizando 600 imagens. As fotos foram editadas com o programa *Corel Draw*, a fim de transformá-las em preto e branco, e salvas com uma resolução de 300 dpi. Para o cálculo da porcentagem de área foliar em relação à foto, foi utilizado o programa *Quant* v. 1.0.1 (VALE; FILHO; LIBERATO, 2003), e, por diferença, foi calculada a porcentagem de abertura do dossel. Estes valores foram transformados à raiz quadrada, e submetidos à análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis (ZAR, 1999) a fim de verificar se as diferenças entre as áreas com relação à porcentagem de abertura do dossel foram significativas.

Realizou-se posteriormente a análise de regressão entre os dados de porcentagem de abertura do dossel e os valores de abundância dos ramos em cada subparcela, a fim de verificar se haveria correlação entre elas, testando a hipótese de que a porcentagem de abertura do dossel, como medida indireta da luz incidente, seria o principal componente físico do ambiente a influenciar a abundância dos ramos em microescala.

Para as análises de abundância e padrão espacial foram utilizados os softwares PASSaGE 2 v. 2.0.8.20 (ROSENBERG, 2001) e Biostat 5.0 (AYRES JR; AYRES; SANTOS, 2007)..

3.2 Desenvolvimento de marcadores microsatélites

3.2.1 Material Vegetal

Como não foi possível a separação entre indivíduos distintos no campo, e pelo número insuficiente de folhas em cada ramo independente à altura do solo, um agrupamento de ramos próximos de *Anacardium humile* foi escolhido ao acaso, entre os identificados na área de coleta da Fazenda Conquista, para obtenção do DNA genômico total (construção da biblioteca). Para a validação dos *primers* desenhados, a coleta não se limitou aos ramos presentes na grade, de forma a garantir a amostragem de indivíduos distintos.

3.2.2 Extração e quantificação de DNA genômico de *Anacardium humile*

Para a extração do DNA genômico de *Anacardium humile*, foi utilizado o protocolo ácido descrito por Csaikl et al. (1998), com alterações.

Imediatamente antes do uso, foram misturados em tubo Falcon 10 mL de Tampão 1 [100 mM de NaOAc; 50 mM de EDTA; 500 mM de NaCl; 2% (p/v) de PVP 40.000; 1,4% (p/v) de SDS, pH 5.5] e 5 mL de Tampão 2 [10% (p/v) PVP 40.000], e a solução foi aquecida em banho-maria a 65°C. Ao atingir esta temperatura, adicionou-se 0,25 g de bissulfito de sódio, agitando levemente o tubo e mantendo-o incubado a 65°C. Em um almofariz com nitrogênio líquido, 5 g de tecido foliar jovem foram macerados com pistilo para o rompimento das membranas celulares. O tecido pulverizado foi transferido para um tubo eppendorff de 2 ml, no qual adicionou-se 1 mL da solução aquecida, sendo o tubo incubado por 6 a 10 min em banho-maria a 65°C. Em seguida, adicionou-se 300 µL do Tampão 3 [5 M de KOAc; 5M de ácido acético] às amostras, mantendo-as no gelo por 30 min. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min, sendo a fase líquida transferida para um tubo novo. Após a transferência, foi adicionado em cada amostra 450 µL de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (ou octanol), na proporção 25:24:1, centrifugando posteriormente a 14.000 rpm por 10 min. Procedeu-se a transferência do sobrenadante para um tubo novo, no qual foram adicionados 600 µL de Clorofórmio, centrifugando novamente a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi novamente transferido

para outro tubo, onde adicionou-se 800 de μL isopropanol gelado para promover a precipitação do DNA. Em seguida, as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C por 30 min e, decorrido este período, foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi vertido do tubo com cuidado para evitar a perda do *pellet*, o qual foi lavado duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. O tubo foi deixado secar à temperatura ambiente e, após sua secagem completa, o *pellet* foi ressuspensionado em 50 μL de TE com RNase em banho-maria a 37°C por 1 h. Ao término do banho-maria, as amostras foram estocadas a -20°C para uso posterior.

A quantificação das amostras de DNA genômico de *Anacardium humile* foi estimada após a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Uma alíquota de cada amostra foi comparada a uma série de concentrações específicas e conhecidas de DNA do fago Lambda (Invitrogen), através da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo (1,0 $\mu\text{g/mL}$) sob UV.

3.2.3 Construção de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites

A construção da biblioteca genômica enriquecida com locos microssatélites foi realizada utilizando o protocolo descrito por Billotte et al. (1999) com modificações, conforme os passos a seguir:

i) Restrição do DNA

Aproximadamente 5,0 μg de DNA genômico foram digeridos por hidrólise enzimática para a geração de fragmentos de tamanhos adequados. Utilizaram-se na reação 5,0 μL da enzima de restrição *RsaI* (10 u/ μL , Invitrogen), adicionando-se 10,0 μL de tampão de reação (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT; 25 $\mu\text{g/ml}$ BSA) e água milliQ autoclavada até completar 100 μL . O material foi incubado a 37°C *overnight*.

ii) *Ligação dos adaptadores*

A enzima T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech) foi utilizada para realizar a ligação dos adaptadores *Rsa21* (5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') e *Rsa25* (5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3') aos fragmentos digeridos de extremidade abrupta, com o objetivo de garantir que todos os fragmentos digeridos tivessem uma terminação comum e conhecida, o que possibilitou a pré-seleção de sequências com microssatélites. Foram utilizados 2 µL do adaptador *Rsa21* (10 µM), 2 µL do adaptador *Rsa25* (10 µM), 6,0 µL do DNA genômico digerido no passo anterior, 5 µL do tampão 5X (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 25 µg/ml BSA), 4,0 µL de T4 DNA ligase (1 u/µL) e água milliQ autoclavada para completar 50,0 µL. Esta reação foi incubada a 20 °C por 2 horas.

iii) *Pré-Amplificação via PCR*

Para gerar uma maior quantidade de DNA para a seleção e para garantir que a ligação tenha ocorrido, os fragmentos digeridos foram submetidos a uma PCR utilizando como *primer* o adaptador *Rsa21*. Após a ligação, os fragmentos foram amplificados utilizando 5 µL do produto da ligação; 2,0 µL do *primer* *Rsa21* (10 µM); 5,0 µL de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 1,5 µL de MgCl₂ (50,0 mM); 4 µL de dNTP (2,5 mM), 5,0 µL de Taq DNA polimerase (3 U) e água milliQ autoclavada para completar 50,0 µL. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 4 minutos, seguida de 20 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Um passo prolongado de extensão de 72 °C por 8 minutos foi adicionado após o último ciclo. Em seguida, utilizou-se o Kit Concert (Invitrogen Life Sciences) para purificar os fragmentos amplificados.

iv) *Seleção dos fragmentos contendo microssatélites*

O processo de enriquecimento foi realizado através da hibridização de oligonucleotídeos conjugados a biotinas, biotIII(CG)₈ e biotIII(GT)₈, complementares a sequências repetitivas

GC e CA. O kit Streptavidine-Magnisphere (Promega), composto por uma estante imantada e por um tubo contendo microesferas magnéticas ligadas à estreptavidina, foi utilizado para recuperar os fragmentos biotinilados contendo tais repetições.

Primeiramente, as microesferas magnéticas ligadas à estreptavidina passaram por uma preparação prévia, que consistiu na homogeneização do tubo no vórtex, seguido da magnetização do mesmo na estante por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado, adicionando-se 300 μL de SSC 0,5X para lavar as microesferas, sendo este procedimento repetido três vezes,. Ao final da lavagem, adicionou-se 100 μL de SSC 0,5X.

A fração enriquecida contendo os fragmentos de DNA previamente ligados aos adaptadores foi incubada a 95°C por 15 minutos para a desnaturação da dupla fita. Ao DNA desnaturado foram adicionados 13 μL de SSC 20X e 3 μL de cada oligonucleotídeo marcado com as biotinas (50 μM). Esta solução de hibridização foi incubada a temperatura ambiente sob constante agitação e, após 20 minutos, foi adicionada às esferas magnetizadas previamente lavadas. A suspensão contendo as esferas magnetizadas e o complexo DNA-sonda foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente sob suave agitação. Após a incubação, a solução foi magnetizada por 30 segundos, descartando-se o sobrenadante e, em seguida, resuspendendo-se a solução em 300 μL de SSC 0,1 X. Estes passos foram repetidos três vezes. Após isto, a solução foi ressuspendida em 100 μL de água e magnetizada por 30 segundos, sendo o sobrenadante transferido para um tubo *eppendorff* e reservado. Por último, a solução foi novamente ressuspendida em 150 μL de água milliQ e magnetizada, e o sobrenadante foi retirado e misturando à solução reservada anteriormente. O volume final, que totalizou 250 μL , foi conservado a -20°C.

v) Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR

Após a seleção dos fragmentos enriquecidos, estes foram submetidos a uma PCR utilizando como *primer* o adaptador *Rsa21*, a fim de gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade. Realizou-se a amplificação utilizando 20 μL do produto da ligação, 4,0 μL do *primer* *Rsa21* (20 μM), 10 μL de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,9), 4,0 μL de MgCl_2 (2,0 mM), 8 μL de dNTP (2,5 mM), 5U de Taq polimerase (Invitrogen) e água milliQ

autoclavada para completar 100,0 μL . Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Um passo prolongado de extensão de 72°C por 5 minutos foi adicionado após o último ciclo.

vi) Clonagem em vetor pGEM-T e transformação em células supercompetentes

Após a amplificação, 6 μL dos produtos da PCR foram adicionados a 1 μL do vetor plasmidial pGEM-T (Promega), 10 μL de tampão 2 X, 1 μL de T4 DNA ligase e 2 μL de água milliQ. Com isto, os fragmentos amplificados via PCR foram ligados a um vetor de clonagem, para a transformação de células XL1-Blue competentes via choque térmico. Para a transformação, 50 μL de solução com células competentes de *E. coli* foram colocadas em gelo 10 minutos antes da manipulação. Decorrido este período, adicionaram-se 6 μL da ligação e 24 μL de Transfobuffer (KCM 10 X e 10% de PEG), agitando suavemente e deixando em gelo por 20 minutos. Após este tempo, os tubos foram levados em banho-maria a 42°C por 2 minutos, a fim de aplicar choque térmico às amostras, e novamente foram colocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram levadas ao fluxo, onde adicionou-se 450 μL de meio SOC pré-aquecido, sendo colocadas a 37°C por 50 minutos. Ao fim deste tempo, os tubos foram centrifugados a 1300 rpm por 30 segundos, e 420 μL do sobrenadante foram descartados, procedendo-se a ressuspensão do restante. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 mg/ml), 60 μL IPTG (24 mg/ml) e 60 μL X-Gal (20 mg/ml). As placas foram incubadas invertidas em estufa a 37 °C *overnight* para o crescimento de colônias.

vii) Manutenção e seleção dos clones

Para garantir que cada construção (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para análise posterior, foram utilizadas placas ELISA com fundo em U, com 80 μL de meio LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) por poço. As colônias brancas, que contêm as

sequências de DNA de *A. humile*, foram repicadas com a ajuda de palitos estéreis, e as placas foram incubadas em estufa a 37 °C *overnight* para o crescimento de colônias. Após esse período, as placas foram armazenadas em freezer -20°C por 30 minutos e, em seguida, armazenadas em freezer -80°C com glicerol 50% (p/v).

viii) Amplificação dos insertos clonados

Para identificar os clones contendo microssatélites e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem, foi realizada uma reação de amplificação dos insertos diretamente das colônias obtidas na etapa anterior. Para isto, colônias individuais foram transferidas com um palito estéril para o tubo de PCR contendo 30,5 µL de água milliQ. Esta suspensão de células foi utilizada em uma reação com volume final de 45,0 µL contendo as seguintes concentrações dos reagentes: 5,0 µL de tampão 10X (50 mM KCl; 10mM de Tris-HCl, pH 8,9), 4,0 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 2,5 µL do *primer Rsa21* (10 mM), 1,0 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL). Esta reação foi submetida a um passo inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos) e um passo final de extensão a 72°C por 8 minutos.

ix) Inoculação e extração plasmidial

Com o objetivo de isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes para posterior sequenciamento, foi adicionado 1 mL de meio *Circle Grow* contendo 100 µg/mL de ampicilina em cada pocinho da microplaca. As colônias individuais foram inoculadas com o auxílio de pipeta multicanal, sendo a placa selada com adesivo perfurado para aeração durante o crescimento. A placa foi incubada a 37°C (*shaker*) a 300 rpm durante 22 horas. Após este tempo, o adesivo da placa foi trocado para que a mesma fosse centrifugada por 6 minutos a 3000 rpm, de forma a sedimentar as células. O sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida sobre papel absorvente por 1 minuto. Após isto, 240 µL de solução GTE [Glicose 20%, Tris 1 M (pH 7,4), EDTA 0,5 M (pH 8,0)] foram adicionados a cada poço, e a placa foi novamente selada

com adesivo para que as células fossem ressuspensas, através de agitação no vórtex por 2 minutos, seguida da centrifugação por 6 minutos a 4000 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 80 µL de GTE em cada pocinho, selando novamente a placa com adesivo para etanol e agitando-a no vortex por 5 minutos. Transferiu-se 60 µL de cada suspensão de células para placa com fundo em U, contendo 5 µL de RNase (10 mg/mL), adicionando-se, em cada pocinho, 60 µL de NaOH 0,2M – SDS 1% (p/v). A placa foi selada com adesivo para que a solução fosse misturada por inversão (cerca de 10 vezes) e incubada 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi centrifugada brevemente, adicionando-se 60 µL de KOAc 3 M a cada pocinho, sendo novamente selada com adesivo para que a solução fosse misturada por inversão (cerca de 10 vezes). Depois da centrifugação, o adesivo foi removido e a placa incubada em estufa a 90°C por 30 minutos, sendo, em seguida, esfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm. Nova fita adesiva foi utilizada para fixar uma placa filtro no topo de uma placa de fundo em U, e transferiu-se todo o volume para a placa filtro, que foi centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm, a 20°C. Após a centrifugação, removeu-se a placa filtro, adicionando-se ao filtrado 110 µL de isopropanol e selando a placa com adesivo para misturar a solução por inversão (cerca de 20 vezes). Centrifugou-se a placa por 45 minutos a 4000 rpm a 20°C, descartando cuidadosamente o sobrenadante e adicionando-se 200 µL de etanol 70% (v/v) gelado. Centrifugou-se a placa novamente por 5 minutos a 4000 rpm a 20°C, descartando o sobrenadante e invertendo a placa sobre papel absorvente. À placa invertida, aplicou-se uma velocidade de até 600 rpm na centrífuga e, após isso, foi deixada por 60 minutos à temperatura ambiente para secar. Por último, o precipitado foi ressuspensado *overnight* em 60 µL de água milliQ.

x) Seleção dos insertos e sequenciamento

Nesta etapa, utilizou-se um *primer* que se reassocia tanto ao sítio T7 como à sequência de microssatélites presentes no inserto, garantindo que somente insertos que contenham microssatélites fossem amplificados. A utilização do *primer* T7 leva à amplificação do sítio inteiro. As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume final de 10 µL contendo 2,0 µL de tampão Save Money (2,5 µL de MgCl₂ 2 M, 200 µL de Tris-HCl 1 M pH 9,0), 0,5 µL

de *primer* T7 (5 pMol/ μ L), 0,4 μ L de Big Dye e de 3 μ L de DNA (1 μ g).

Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos (96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos, 60°C por 4 minutos) e um passo final a 4°C até retirar a reação da máquina. Para eliminar possíveis interferentes ou excessos de reagentes da reação de sequenciamento e deixar as amostras prontas para a eletroforese, as amostras foram purificadas, sendo adicionados às mesmas 80 μ L de isopropanol 65% (v/v) com leve agitação. Após 15 minutos a temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 3000 rpm por 45 minutos, descartando o sobrenadante em seguida e mantendo-a invertida por 1 minuto em papel absorvente para secar. Foram adicionados 200 μ L de etanol 60% (v/v), centrifugando a placa a 3000 rpm por 10 minutos, novamente descartando o sobrenadante e mantendo-a invertida por 1 minuto em papel absorvente para secar. A placa invertida foi levada à centrifuga para um *spin* e, em seguida, ao fluxo laminar, onde permaneceu por 1 hora para secar.

Depois de realizada a extração e purificação, a sequência de cada clone selecionado foi determinada através da análise em sequenciador automático.

xi) Análises das sequências e desenho dos primers

Os arquivos contendo os cromatogramas, provenientes do sequenciamento, foram primeiramente convertidos em extensão FASTA através do programa *Bioedit* v. 7.0.9. Após a conversão, cada arquivo contendo as sequências foi submetido ao programa *Websat* (<http://wsmartins.net/websat/>) (MARTINS et al., 2009) para a identificação dos microssatélites. Os parâmetros para número de repetições por motivo foram 10, 5, 3, 3, 3, 3 para mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, respectivamente. Identificados os microssatélites, as sequências foram submetidas ao programa *VecScreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), para que as sequências dos vetores utilizados na construção da biblioteca fossem reconhecidas e excluídas. Após isto, as sequências foram submetidas ao programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (ROZEN; SKALETSKY, 2000), para que o desenho dos *primers* fosse possível, sendo excluídos nesta etapa as sequências dos adaptadores *Rsa21* e *Rsa25* e o sítio de reconhecimento da enzima de restrição (GTAC). Os critérios para o desenho foram: tamanho do produto de amplificação de 100 a 330 pb, tamanho dos oligonucleotídeos entre 18 a

22 bases, temperatura de anelamento entre 45°C e 60°C, conteúdo de GC entre 40 a 60% e diferença de temperatura de anelamento máxima entre cada par do *primer* de até 3°C. Após o desenho, as sequências dos *primers* foram analisadas no programa *Chromas* v. 2.33, para avaliar a qualidade dos eletroforegramas destas regiões. Ao se constatar a qualidade das sequências, utilizou-se o programa *Gene Runner*, inserindo o par de *primers* a fim de analisar a formação de estruturas secundárias (*hairpins*, dímeros e *loops*).

xii) Validação de uma amostra de primers

Os pares de *primers* de melhor qualidade foram enviados à síntese química e, seguida, submetidos ao teste de validação, a fim de observar se houve amplificação positiva em uma série de reações de PCR em esquema *touch-down*. As amplificações foram padronizadas para cada loco, variando as concentrações de DNA molde e MgCl₂ (Tabela 1) e a temperatura de reassociação (Tabela 2). Após as amplificações, os resultados foram visualizados em gel de agarose 3% (p/v), utilizando-se um marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb durante a corrida, para determinar o tamanho dos fragmentos.

Tabela 1 – Reagentes e condições utilizadas para otimização dos *primers* de *Anacardium humile*

Reagentes	Condições
DNA molde	DNA não diluído; 1:10; 1:20; 1:50; 1:100
Cloreto de magnésio (MgCl ₂)	1,5 mM; 2,5mM
Tampão	1X
dNTP	0,25 mM
<i>Primer</i> F	0,5 mM
<i>Primer</i> R	0,5 mM
<i>Taq</i> polimerase (LGC Biotecnologia)	1 U
Água deionizada	Completar reação

Tabela 2 – Condições de amplificação em esquema *touch-down* PCR

Nº Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	5 min
11	94°C	45 s
	62°C (- 1°C por ciclo)	45 s
	72°C	45 s
30	94°C	45s
	48; 50; 51,3; 52,9; 54,7; 56,4; 57,2; 58,7; 60,1; 61,3; 62°C	45 s
	72°C	45 s
1	72°C	10 min
1	4°C	∞

Os pares de *primers* que apresentaram amplificação positiva foram submetidos a novas reações com uma amostra de indivíduos de *Anacardium humile* coletados nas duas áreas de estudo. Os produtos resultantes das reações foram separados em gel acrilamida 7%, utilizando-se um marcador de peso molecular *Ladder* 10 pb, a fim de determinar o tamanho dos fragmentos. Os géis foram visualizados por coloração com nitrato de prata (AgNO₃), de acordo com protocolo de Creste; Tulmann; Figueira (2001).

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos demográficos de *Anacardium humile*

Todos os *ramets* de *A. humile* foram amostrados por contagem nos três *grids*, sendo que não foram encontrados *ramets* no *grid* 2 (Fazenda Conquista). Com relação ao *ramets* com ataque de *Contarinia sp.*, sua maior incidência ocorreu no *grid* 1, em mais da metade dos *ramets* amostrados.

Em macroescala (entre fragmentos), verificou-se o padrão agregado de distribuição para o total dos ramos e para os ramos com e sem ataque de *Contarinia sp* ($ID > 1$).

Tabela 3 – Valores do n° *ramets*, média do n° *ramets* por *grid* ($\bar{x}$), variância do n° *ramets* por *grid* (s^2), Índice de Dispersão (ID), para as plantas com e sem ataque de *Contarinia sp* e para o total de *ramets* observados nos três *grids*

Parâmetros	Grid 1			Grid 2			Grid 3		
	Com	Sem	Total	Com	Sem	Total	Com	Sem	Total
N° <i>Ramets</i>	1235	945	2178	0	0	0	812	3438	4250
$\bar{x}$	6,175	4,725	10,89	0	0	0	4,06	17,19	21,25
s^2	73,09	34,75	180,13	0	0	0	31,92	326,24	451,08
$ID = \sigma^2 / \bar{x}$	11,83	7,35	16,54	0	0	0	7,86	18,97	21,22

Em microescala (dentro de fragmentos), nos *grids* 1 e 3, verificou-se o padrão agregado de dispersão dos *ramets* com e sem ataque de *Contarinia sp* e do total de *ramets* por parcela para as classes de distância menores (autocorrelação positiva). À medida que as classes de distância aumentam, foram observados valores não significativos, indicando aleatoriedade nestas classes, e valores significativos negativos (autocorrelação negativa), indicando regularidade (Figuras 6 e 7).

Figura 6 – Correlogramas espaciais da abundância de ramos para o *grid* 1: (a) com ataque de *Contarinia* sp , (b) sem ataque e (c) total ramos

Figura 7 – Correlogramas espaciais da abundância de ramos para o *grid* 3: (a) com ataque de *Contarinia sp*, (b) sem ataque e (c) total ramos

Pela análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, observaram-se diferenças significativas com relação à porcentagem de abertura nos três *grids* (Figura 8)

Figura 8 - Gráfico da análise de Kruskal-Wallis mostrando as diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os três pares de *grids* analisados quanto à porcentagem de abertura do dossel.

A partir da transformação dos dados de porcentagem de abertura do dossel em raiz quadrada, a fim de ajustá-los à distribuição normal, realizou-se a análise de regressão linear simples, com os dados da densidade de *ramets*. Para o *grid* 1, observou-se uma tendência de aumento do número de *ramets* de acordo com o aumento da porcentagem de abertura do dossel, mas o coeficiente de determinação apresentou um valor baixo ($r = 0,0765$), não mostrando correlação entre as variáveis (Figura 9a). Para o *grid* 3, o coeficiente de determinação foi igual a zero, não havendo correlação entre as duas variáveis (Figura 9b).

Figura 9 – Regressão linear simples entre a porcentagem de abertura do dossel e a densidade de ramets de *A. humile*, em (a) grid 1 [$Y = -5,714 + 0,2766X$; $R^2(\text{ajustado}) = 0,0718$], e em (b) grid 3 [$Y = 20,8809 + 0,0396X$; $R^2(\text{ajustado}) = -0,005$]

4.2 Desenvolvimento de microssatélites

Para a extração de DNA para a construção da biblioteca genômica de *Anacardium humile* foram utilizados cerca de 250 g de material vegetal, a fim de se obter a concentração de DNA requerida pelo protocolo de Billote (1999), que é de 5000 ng. A quantificação do DNA foi estimada em 75 ng/ μ L (150 ng/ 2 μ L de amostra). A digestão de DNA com a enzima *Rsa*I não resultou em fragmentos de tamanhos preferenciais, embora a maioria dos fragmentos mostrou tamanhos entre 700 a 1000 pb, em comparação ao *Ladder* 100 pb. A ligação dos adaptadores *Rsa*21 e *Rsa*25 foi confirmada pela pré-amplificação, e a purificação resultou em fragmentos de cerca de 400 a 900 pb, ambas em comparação ao *Ladder* 100 pb.

Figura 10 – Géis de agarose 1% utilizados como controle na extração e na construção da biblioteca de microssatélites de *A. humile*: (a) quantificação de DNA obtido na extração, em que as quatro primeiras bandas, da esquerda para a direita, referem-se ao DNA Lambda de 25, 50, 100 e 150 ng/ μ L, sendo a quinta banda referente ao DNA de *A. humile*, (b) digestão do DNA genômico, (c) pré-amplificação dos fragmentos, (d) purificação dos fragmentos. O *Ladder* utilizado em (b), (c) e (d) é de 100 pb

A construção da biblioteca resultou em 180 clones, dos quais 84 foram enviados ao sequenciamento. Destes, foram detectados pelo *Websat* (MARTINS et al., 2009) 23 clones

contendo microssatélites, o que representa um enriquecimento da biblioteca de 27,38%. Dezoito clones (21,42%) apresentaram qualidade de sequenciamento ruim, visualizada no programa *Chromas* v.2.33 pela observação de picos múltiplos nos eletroforegramas, e 43 não mostraram microssatélites. Através do programa *Clustal X* (THOMPSON et al., 1997), identificaram-se quatro sequências com redundância, sendo eliminados da análise as repetidas. Sete pares de *primers* foram complementares às sondas GT e CT utilizadas.

Foram encontrados 34 microssatélites no total, sendo os dinucleotídeos os mais abundantes (11 sequências), seguidos dos hexanucleotídeos (10 sequências), e dos tetranucleotídeos (6 sequências). Os mononucleotídeos, pentanucleotídeos, trinucleotídeos e os compostos (que apresentam mais de um motivo) estavam presentes em menor número (respectivamente, 3, 2, 1 e 1 sequências). Dentre os motivos, os dinucleotídeos TG/GT encontram-se em maior número (6 sequências), seguidos dos mononucleotídeos T (5 sequências), e dos dinucleotídeos AT (3 sequências). Com relação à classe, os microssatélites perfeitos apresentam maior número, em 31 sequências, seguidos dos imperfeitos (2 sequências) e dos compostos (1 sequência).

Figura 11 – Porcentagens dos microssatélites encontrados em relação ao motivo (a) e em relação à classe (b)

Dentre os 34 microssatélites obtidos, foram desenhados 15 pares de *primers* complementares às regiões flangeadoras dos microssatélites. O desenho dos *primers* restantes não foi possível devido à presença de sequências de baixa qualidade, e também por algumas sequências estarem próximas das extremidades. Os *primers* dos clones AHP1F11 e AHP1D11 foram desenhados a mão, uma vez que os obtidos pelo programa *Primer3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000) não se enquadraram nos parâmetros do programa *Gene Runner* (valores de

entalpia (ΔG) menores que $-2,5$, indicando a formação de estruturas secundárias, como *hairpins*, dímeros e *loops*, bem como a diferença de temperatura de GT + AT entre os *primers forward* e *reverse* maior que 4°C).

Tabela 4 – Clones contendo sequências de microssatélites, dos quais foram desenhados *primers* para *A. humile*. Motivo, classe e tamanho do fragmento sequenciado (pb)

Clone	Motivo	Classes	Tamanho (pb)
AHP1B01	(T) ₁₂	Perfeito	105
AHP1B01	(CCTT) ₃	Perfeito	171
AHP1B07	(GT) ₉	Perfeito	175
AHP1C07	(CTCTGA) ₃	Perfeito	221
AHP1D09	(GT) ₁₀	Perfeito	248
AHP1D11	(TG) ₅	Perfeito	98
AHP1E04	(TG) ₅	Perfeito	231
AHP1E04	(TA) ₅	Perfeito	160
AHP1E06	(TG) ₆ N ₁ (ATAC) ₃ N ₂₂ (ATAC) ₁₁	Composto/Imperfeito	283
AHP1E08	(AG) ₅	Perfeito	175
AHP1F03	(T) ₁₁ N ₃ (T) ₁₀	Imperfeitos	225
AHP1F07	(ACC) ₄	Perfeito	198
AHP1F10	(CCTG) ₃	Perfeito	275
AHP1F11	(TATTT) ₃	Perfeito	71
AHP1G11	(TA) ₇	Perfeito	183

Dos quinze pares de *primers* enviados à síntese química e submetidos à otimização, oito mostraram amplificação positiva em gel de agarose, com variação na intensidade da banda entre os locos (Figura 12). Como dois *primers* apresentaram padrão de bandas muito fraco e com grande quantidade de bandas inespecíficas, sete foram submetidos à validação com oito indivíduos de *A. humile* em gel de acrilamida 7%. Com relação aos reagentes otimizados, os *primers* apresentaram melhor desempenho a uma concentração de cloreto de magnésio de 1,5mM e na diluição de DNA de 1:100. A temperatura de reassociação foi variável entre os locos (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de temperatura de reassociação para os *primers* que apresentaram amplificação positiva na otimização em gel de agarose 2%. Cada par de *primer* é representado por seu motivo correspondente

<i>Primers</i>	Motivo	Temperatura reassociação
AHP1B01-2	(CCTT) ₃	56,4°C
AHP1E04-1	(TG) ₅	54,7°C
AHP1E04-2	(TA) ₅	60,0°C
AHP1F03	(T) ₁₁ N ₃ (T) ₁₀	54,7°C
AHP1F07	(ACC) ₄	56,4°C
AHP1F11	(TATTT) ₃	57,2°C
AHP1G11	(TA) ₇	54,7°C

Figura 12 – Exemplo de otimização de temperatura de reassociação do par de *primers* AHP1E04-2 em gel de agarose 2%. Das onze temperaturas testadas (Tabela 2), foi escolhida a temperatura de número 9, de 60°C. O *Ladder* utilizado é de 100 pb

Os sete pares de *primers* que amplificaram foram submetidos a uma nova reação de PCR com oito indivíduos de *A. humile* (quatro indivíduos coletados na área Estrela, e quatro coletados na área da Fazenda Conquista). Os produtos resultantes da reação foram visualizados em gel de acrilamida 7% (Tabela 6). Os *primers* AHP1B01-2 e AHP1G11 não mostraram amplificação neste gel, e somente o par de *primers* AHP1F07 foi polimórfico.

Tabela 6 – Resultados da amplificação dos *primers* para oito indivíduos de *A. humile* em gel de acrilamida 7%. Valores, em pb, dos alelos esperados e observados no gel, além da análise genética de cada loco (P para polimórfico, M para monomórfico)

<i>Primers</i>	Motivo	Alelo esperado (pb)	Alelo observado (pb)	Análise Genética
AHP1B01-2	(GT) ₉	171	-	-
AHP1E04-1	(TG) ₅	231	224	M
AHP1E04-2	(TA) ₅	160	182	M
AHP1F03	(T) ₁₁ N ₃ (T) ₁₀	225	235	M
AHP1F07	(ACC) ₄	198	217/223	P
AHP1F11	(TATTT) ₃	71	71	M
AHP1G11	(TA) ₇	183	-	-

5 DISCUSSÃO

5.1 Aspectos da demografia de *Anacardium humile*

Entre os fragmentos de cerrado estudados em Itirapina, os *ramets* de *Anacardium humile* foram mais abundantes no *grid* 3, sendo quase 50% superiores em número em relação ao *grid* 1, e ausentes no *grid* 2. A maior incidência de ataque de *Contarinia sp* foi verificada para o *grid* 1, (Tabela 3). Até o momento, não havia registro na literatura sobre a abundância da espécie e sobre a incidência de ataque dos insetos galhadores, e, mesmo não sendo possível estimar o tamanho efetivo da população, uma vez que não há como distinguir visualmente os indivíduos, esse resultado dá uma idéia da magnitude de estruturas vegetativas da espécie e do ataque de patógenos em diferentes áreas de cerrado.

Em macroescala, o Índice de Dispersão (*ID*) para os dois *grids* onde a espécie ocorreu mostrou agregação, sendo seu valor maior no *grid* 3 devido à elevada variância no número de *ramets* entre as subparcelas em relação à média dos mesmos. Isso pode indicar uma preferência de *A. humile* por ambientes mais abertos. Já para os *ramets* com ataque de *Contarinia sp.*, o valor de *ID* foi maior no *grid* 1 em relação ao *grid* 3, o que pode dizer que, em larga escala, a incidência do ataque é maior em áreas mais fechadas.

Os três *grids* apresentaram diferenças significativas quanto à porcentagem de abertura de dossel, mostrando heterogeneidade de luz. Essa heterogeneidade fica mais evidente quando se compara o elevado número de *ramets* no *grid* 3 com a ausência dos mesmos no *grid* 2, o que sugere que a luz é um dos fatores ambientais de distribuição da espécie em larga escala, o que corrobora com observações que apontam a espécie como heliófila (ALMEIDA et al., 1998). Assim, esta análise é importante para observar os processos geradores de padrão em larga escala (DALE; 1999).

Em microescala, a análise de autocorrelação espacial mostrou uma alta similaridade entre parcelas na primeira classe de distância para os *grids* 1 e 3 (Figura 6c e 7c), indicando o padrão agregado de dispersão dos *ramets*. Para os *ramets* com ataque de *Contarinia sp.*, esta análise também mostrou agregação na primeira classe de distância em ambos os *grids*, sendo que, no *grid* 1, a agregação permanece por mais três classes de distância seguintes. Ou seja, as relações

entre os valores da variável não são devidas ao acaso, demonstrando falta de independência destes valores a determinada classe de distância. Conforme as classes de distância aumentam, em todos os gráficos, o coeficiente de correlação torna-se não significativo, indicando aleatoriedade.

Quando a autocorrelação é negativa, observa-se uma similaridade mínima entre os valores da variável a determinadas classes de distância. De acordo com Dale (1999), picos negativos no correlograma mostram que a similaridade pára de decrescer, e, se há um padrão repetido, a similaridade volta a crescer novamente. O primeiro pico negativo no correlograma indica a escala do padrão, ou seja, a distância média entre parcelas distintas para os valores da variável de estudo.

Nos correlogramas da densidade de *ramets* de *A. humile*, o primeiro pico negativo mostra a distância média entre parcelas dissimilares, ou seja, a distância entre agregados. Para o total de *ramets* no *grid* 1 e no *grid* 3, os valores da distância média entre agregados são, respectivamente, de entre 60 e 65 metros e entre 40 e 45 metros. Ou seja, no *grid* 3 a proximidade entre os agregados é maior em relação ao *grid* 1. Já para os dados do ataque de *Contarinia sp.*, o *grid* 1 mostra que os agregados de *ramets* com ataque estão distanciados em média entre 50 e 55 metros, enquanto para o *grid* 3 este valor é entre 25 a 30 metros.

Da análise de regressão linear simples entre a densidade de *ramets* por e as porcentagens de abertura do dossel (Figura 9a), foi observado que, em microescala, a abundância dos ramos em ambos os *grids* é pouco correlacionada à porcentagem de abertura, sendo o padrão nesta escala não explicável pela variável ambiental escolhida e devida a outros fatores. Para o *grid* 1, um ambiente no qual a luz é limitante, observa-se uma tendência de aumento do número de ramos de acordo com o aumento da porcentagem de abertura do dossel, mas a correlação é baixa. Para o *grid* 3, essa correlação nem existe (Figura 9b). Assim, trata-se de um ambiente onde a luz não é um fator limitante, ou seja, a planta apresenta maior eficiência fotossintética, aumentando a ramificação e foliação e, conseqüentemente, a agregação dos *ramets*.

Logo, como em ambas as escalas a agregação se confirmou, isso evidencia que as relações entre a maior parte dos *ramets* são diferentes do acaso. Em microescala, o padrão agregado de distribuição dos indivíduos pode estar relacionado a diversos fatores, desde microssítios com recursos favoráveis ao seu recrutamento e crescimento, ação de dispersores e modo de reprodução da espécie (Dale, 1999). Para *A. humile*, a agregação é devida a estrutura da planta descrita na literatura, em que os ramos subterrâneos crescem paralelos ao solo.

Embora ainda não seja possível a distinção entre os indivíduos, uma vez que a sobreposição dos *ramets* pode ser freqüente, os resultados obtidos possibilitam esclarecer alguns aspectos da distribuição espacial. O primeiro é a questão da escala, referente a áreas com diferentes porcentagens de abertura de dossel. Em macroescala, a agregação e ocorrência da espécie parecem estar relacionadas diretamente à luminosidade, enquanto, em microescala, a luminosidade pode exercer um papel importante no estabelecimento e recrutamento de indivíduos, sem, contudo, determinar a agregação dos *ramets*.

Outro aspecto é a distância entre os agregados de *ramets* em vários ambientes. Isto permitirá, em etapas futuras da pesquisa e juntamente ao desenvolvimento de marcadores moleculares para a espécie, avaliar se a distância média entre os agregados corresponde à distância entre indivíduos distintos. A compreensão de modo como os indivíduos de *A. humile* ocupam o espaço em diferentes fitofisionomias de cerrado será importante para o estabelecimento da área mínima necessária para a conservação e preservação da espécie.

4.2 Desenvolvimento de microssatélites

A porcentagem de enriquecimento de clones positivos obtida com a construção da biblioteca genômica (27,38%), apesar de não ser alta e de só corresponder aos clones enviados ao sequenciamento, está dentro dos limites observados no protocolo de Billote et al. (1999), entre cerca de 20 e 70%, sendo superior aos primeiros métodos tradicionais de isolamento de microssatélites, cuja porcentagem varia entre 0,04 e 12% (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

Esta porcentagem pode depender de vários fatores. Existem fatores inerentes à espécie, como a presença de poucas regiões repetitivas no genoma e a composição de bases do mesmo, a qual interfere sobre a enzima de restrição utilizada durante a digestão. A posição do sítio de clivagem da enzima de restrição no DNA pode influenciar o tamanho do fragmento obtido e a representatividade das regiões repetitivas amostradas, indicando que o uso combinado de enzimas com sítios de clivagem distintos pode produzir fragmentos entre 200 a 1000 pb, ideais para os demais passos da construção da biblioteca. Outro fator são as terminações dos fragmentos digeridos, que podem dificultar a ligação dos adaptadores, o que requer condições experimentais ótimas para a ligação e adaptadores que, por sua vez, possuam elementos de terminação coesivos. Na etapa de hibridização com sondas biotiniladas, os tipos de sonda utilizados e as condições de lavagem das microesferas também pode influenciar sobre a obtenção de sequências repetidas (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

Para *A. humile*, a ausência de fragmentos de tamanhos preferenciais durante a digestão indica que a enzima utilizada (*RsaI*) foi eficiente na clivagem do DNA. A pré-amplificação confirmou a ligação dos adaptadores *Rsa21* e *Rsa25*, mostrando uma grande amplitude de tamanho de fragmentos, mas com certa concentração de fragmentos de tamanho maior (cerca de 1000 pb, em comparação ao *Ladder* 100 pb), o que foi corrigido pela purificação (Figura 10). O fato de que a maior parte dos *primers* obtidos não tenha sido complementar às sondas GT e CT utilizadas mostra que as sondas biotiniladas foram eficientes para hibridizar diversos microssatélites.

O número de repetições por motivo utilizados para a busca de microssatélites de *A. humile* pelo programa *Websat* (10, 5, 3, 3, 3, 3 para mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, respectivamente) está de acordo com outros trabalhos na literatura, com pequenas modificações

no número de di e trinucleotídeos. Penha (2007), por exemplo, utilizou 10 e 9 números de repetição de di e trinucleotídeos para a busca de microssatélites em *Passiflora alata*. Ellegren (2004) ressaltou que não existe um consenso entre os pesquisadores sobre o número mínimo de repetições que caracteriza um loco como microssatélite, e que isto pode interferir na quantidade de microssatélites obtidos na busca. No caso de *A. humile*, observou-se que a maioria dos motivos não apresentaram número de repetições acima de 10 (principalmente di e trinucleotídeos) e, dessa forma, os parâmetros foram ajustados para aproveitar os microssatélites com comprimento de cerca de 10 pb. Este tamanho mínimo considerado deve-se a evidências que locos menores que 5 repetições apresentam menor taxa de mutação e, conseqüentemente, menor polimorfismo (ZHU; STRASSMANN; QUELLER, 2000).

Mais da metade dos microssatélites encontrados para *A. humile* não puderam ser desenhados, devido à proximidade da região repetitiva das extremidades, sendo a região flanqueadora insuficiente em número de bases para o desenho de um dos *primers*, e devido à qualidade de seqüenciamento ruim, que pôde ter sido ocasionada por contaminação cruzada de amostras ou por problemas no momento do seqüenciamento. Neste último aspecto, Penha (2007) comentou que a polimerização do seqüenciamento pode gerar um decréscimo da qualidade da seqüência, tornando-a imprópria para o desenho de *primers*. Essa polimerização também pode ocorrer após o seqüenciamento de uma região repetitiva, sendo lida apenas uma das regiões flanqueadoras.

Com relação aos motivos observados, os dinucleotídeos TG/GT constituem os mais abundantes, seguidos dos mononucleotídeos T e dos dinucleotídeos AT/TA, sendo a presença destes últimos motivos, segundo Ellegren (2004), uma característica do genoma de plantas. Para *A. occidentale*, Croxford, Robson e Wilkinson (2006) isolaram 21 locos polimórficos através de biblioteca genômica não enriquecida, a maioria compostos, dos quais 13 apresentaram os motivos (GT/TG)_n ou seus complementares, e 12 apresentaram os motivos ou (TA/AT)_n. Para a espécie *Astronium urundeuva*, também do gênero *Anacardium*, dos nove microssatélites isolados, cinco apresentaram os motivos (AT/TA)_n, além da ocorrência de seqüências poliT, semelhantes às observadas em *A. humile*, confirmadas em 6 microssatélites cujos *primers* não foram desenhados (CAETANO et al., 2005).

Quanto à otimização dos *primers*, a diluição de DNA de 1:100 mostrou melhores resultados para o aparecimento de ampliações em gel de agarose. Quando se utiliza DNA não

diluído, resíduos da extração, como fenol e clorofórmio, e componentes químicos das folhas podem inibir as reações de PCR, resultando em ausência de amplificação. A amplitude de temperaturas de reassociação utilizadas (48 a 62°C, com 11 temperaturas) foi necessária, pois a intensidade do padrão de bandas em gel de agarose foi fraca nas temperaturas de anelamento estimadas durante o desenho de muitos *primers*. O esquema de PCR *touch-down* (15 ciclos iniciais, com decréscimo de 1°C por ciclo) mostrou eficiência, uma vez que a redução de temperatura de reassociação, a partir de temperaturas mais altas, permite um número maior de anelamentos específicos, possibilitando também aos *primers* maior chance de amplificar numa dada temperatura ótima.

A amplificação negativa de seis pares de *primers* de *A. humile* e o padrão de bandejamento pouco intenso e inespecífico observado em dois pares de *primers* podem ser devidos, provavelmente, à problemas com a otimização, sendo necessários testes futuros com temperaturas acima de 65°C para alguns *primers*, como também a otimização das concentrações de dNTP, da enzima *Taq polimerase* e da própria concentração dos mesmos. Estes déficits de amplificação também podem resultar do não atendimento dos parâmetros necessários ao desenho de *primers* funcionais [valores de entalpia (ΔG) menores que - 2,5, diferença de temperatura de GT + AT entre os *primers forward* e *reverse* maior que 4°C, % GC menor que 40%]; contudo, para *A. humile*, estes parâmetros foram considerados para o desenho de todos os pares de *primers*, e aqueles que não os atenderam foram descartados.

A amplificação de cinco pares de *primers* avaliados em gel de acrilamida 7% com apenas um mostrando polimorfismo ainda é um resultado preliminar, uma vez que apenas oito indivíduos de *A. humile* foram avaliados. Dois indivíduos de *A. humile* coletados na área Estrela são polimórficos em relação aos demais indivíduos da área e em relação aos indivíduos coletados na área da Fazenda Conquista, o que mostra que ao menos o par de *primers* AHP1F07 tem potencial para ser considerado como um marcador genético.

Vários trabalhos na literatura mostram que a porcentagem de clones positivos, o número de microssatélites obtidos em bibliotecas genômicas enriquecidas e a quantidade de *primers* polimórficos são variáveis. Dentro do gênero *Anacardium*, Caetano et al. (2005) obtiveram 24 microssatélites em cada uma das duas bibliotecas de 4700 e 2500 clones de *Astronium urundeuva*, o que representa uma porcentagem de enriquecimento de, respectivamente, 0,15 e 0,68%. Os autores selecionaram 16 pares de *primers* para o desenho, dos

quais nove amplificaram.

Estes números foram variáveis mesmo entre bibliotecas desenvolvidas para uma mesma espécie. Para a manga, que também pertence à família Anacardiaceae, existem pelo menos três bibliotecas construídas. Duval et al. (2005) obtiveram 192 clones dos quais 116 foram positivos (61%), encaminhando 41 ao sequenciamento, o que resultou cerca de 35 sequências únicas de microssatélites para o desenho dos *primers*. A amplificação destes *primers* desenhados foi de 100%. Schennel et al (2005) não informaram sobre a porcentagem de enriquecimento, mas desenharam 41 pares de *primers*, dos quais 15 amplificaram. Honsho et al. (2005) enviaram ao sequenciamento 16 clones de sinal positivo em reações de PCR com *primers* 5' ancorados, resultando 12 microssatélites para o desenho dos *primers*.

A obtenção do *primer* polimórfico AHP1F07 representa, em relação aos *primers* desenhados e em relação aos obtidos na biblioteca genômica, um aproveitamento de, respectivamente, 6,66% e 2,94%. Estes valores estão abaixo dos observados por Squirrell et al. (2003) em uma série de trabalhos científicos. Segundo dados dos próprios autores, o desenvolvimento de dez pares de *primers* polimórficos requer, em média, o sequenciamento de 104 clones, a identificação de 65 locos microssatélites e o desenho de 31 pares de *primers*. Isto dá uma idéia do esforço para o isolamento destes locos, e sugere que, para *A. humile*, mais clones deverão ser sequenciados e que outras otimizações com os *primers* desenhados deverão ser realizadas.

O sequenciamento dos clones de *A. humile* foi realizado em parte das amostras e em apenas uma das fitas de DNA. O sequenciamento posterior das amostras restantes e da fita complementar dos clones nos quais uma das regiões flangeadoras estava comprometida pode possibilitar o desenho de mais *primers* e o isolamento de mais locos microssatélites.

A similaridade de motivos microssatélites encontrados entre *A. humile*, *A. occidentale* e *Astronium urundeuva* pode indicar a presença de regiões conservadas entre estas espécies, com locos diferindo no número de repetições mas com regiões flangeadoras homólogas, permitindo a utilização de *primers* desenhados para uma espécie em outra. Oliveira et al. (2006) ressaltaram a importância da transferibilidade de *primers* entre espécies relacionadas, permitindo acessar locos não contemplados no isolamento de microssatélites de uma espécie ou possibilitando acessar os locos em espécies cujo isolamento é dificultado pela frequência baixa de regiões repetitivas. Para *A. humile*, a transferibilidade entre estas espécies pode complementar o número de locos obtidos

com a construção da biblioteca.

O desenvolvimento de marcadores microssatélites para *A. humile* será importante para determinar o sistema reprodutivo da espécie e para a análise da estrutura genética de populações, possibilitando a obtenção de estimativas do tamanho efetivo populacional e a diferenciação genética intra e interpopulacional, além de ser fundamental para estimar o fluxo gênico e a deriva genética. O conhecimento destas características populacionais ajudará a compreender os efeitos dos processos ecológicos e da fragmentação do cerrado sobre a dinâmica evolutiva da espécie, auxiliando em sua conservação *in situ*.

6 CONCLUSÕES

Com relação à demografia de *A. humile*:

- Os métodos utilizados foram eficientes para estimar a abundância de ramos e para avaliar o padrão espacial
- O padrão espacial dos *ramets* é agregado em ambas as escalas de observação
- O padrão espacial da espécie em microescala deve-se à sua forma de vida

Com relação à construção de bibliotecas genômicas:

- O protocolo de desenvolvimento de bibliotecas genômicas foi eficiente em *A. humile*
- Embora nem todos os *primers* tenham amplificado, os procedimentos adotados para o desenho dos *primers* foram adequados
- As análises foram preliminares, com um dos microsatélites com potencial para marcador genético

REFERÊNCIAS

- AB' SÁBER, A. N. **Os domínios de natureza do Brasil: potencialidades paisagísticas**. São Paulo: Ateliê Editorial, 2003. 160p.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; SANTOS, A.S. **Biostat**. Versão 5.0. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007.
- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999. 443 p.
- BARBOSA, A.A.A. **Biologia reprodutiva de uma comunidade Campo Sujo, Uberlândia, MG**. 1997. 200 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- BATALHA, M.A.; MANTOVANI, W. Reproductive phenological patterns of Cerrado plant species at the Pé-de-Gigante reserve (Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brazil): a comparison between the herbaceous and woody floras. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 60, p. 129-145, 2000.
- BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. **Ecology: from individuals to ecosystems**. Oxford: Blackwell Scientific Publishing, 2007. 759 p.
- BERNACCI, L.C. **Aspecto da demografia da palmeira nativa *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman, jervá, como subsídios ao seu manejo**. 2001. 134 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite – enriched libraries: applied methodology for the development of SSRs markers in tropical crops. **Fruits**, New York, v. 54, p. 277-288, 1999.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.
- BUENO, A. de A.; BELENTANI, S.C. da S.; MOTTA-JUNIOR, J.C. Feeding Ecology of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) (Mammalia:Canidae), in the Ecological Station of Itirapina, São Paulo State, Brasil. **Biota Neotropica** 2. 2002. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/abstract?article+BN0180202200>>. Acesso em: 01 abr. 2007.
- CAETANO, S.; SILVEIRA, P.; SPICHIGER, R; NACIRI-GRAVEN, Y. Identification of microsatellite markers in a neotropical seasonally dry forest tree, *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 21-23, 2005.

CARVALHO, M.P.; SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. Emergência de plântulas de *Anacardium humile* A. St.-Hil (Anacardiaceae) avaliada por meio de amostras pequenas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, p. 627-633, 2005.

CASTRO, A.A.J.F.; MARTINS, F.R.; TAMASHIRO, J.Y.; SHEPHERD, G.J. How rich is the flora of Brazilian cerrados? **Annals of Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 86, p. 192-224, 1999.

CAVASSAN, O. O cerrado do estado de São Paulo. In: KLEIN, A. L. (Org.). **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: UNESP, 2002. 105 p.

COLLARD, B.C.Y; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, Netherlands, v. 142, p. 169-196, 2005.

COSTA, R. C. da. **Distribuição espacial e relações alométricas de espécies de Vochysiaceae em fragmentos de cerrado do município de Itirapina, São Paulo**. 2006. 52p. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

COUTINHO, L.M. O conceito de Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 7, p. 17-23, 1978.

COUTINHO, L.M. O bioma do cerrado. In: KLEIN, A. L. (Org.). **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: UNESP, 2002. 105 p.

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

CROXFORD, A.E.; ROBSON, M.; WILKINSON, M.J. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci in cashew (*Anacardium occidentale* L.) and their cross – species utilization. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, p.249-251, 2006.

CSAIKL, U.M.; BASTIAN, H.; BRETTSCHEIDER, R; GAUCH, S.; MEIR, A; SCHAUERTE, M.; SCHOLZ, F.; SPERISEN, C.; VORNAM, B.; ZIEGENHAGEN, B. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maximum preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. **Plant Molecular Biology Reports**, New York, v.16, p.69-86, 1998.

DALE, M.R.T. **Spatial pattern analysis in plant ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. 326 p.

DALPONTE, J.C.; LIMA, E.S. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora-Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, p. 325-332, 1999.

DUVAL, M.F.; BUNEL, J.; STIBON, C; RISTERUCC, A. M. Development of microsatellite markers for mango (*Mangifera indica* L.). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 825-826, 2005.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 5, p. 435-444, 2004.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 412 p.

FERREIRA; M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FORTIN, M.J.; DALE, M.R.T; HOEF, J. ver. Spatial analysis in ecology. In: EL-SHAARAWI, A.H.; PIEGORSCH, W.W. (Org). **Encyclopedia of Environmetrics**. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. p. 2051-2058.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 280 p.

GALETTI, M.; PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. Fenologia, frugivoria e dispersão de sementes In: CULLEN JR, L., RUDRAN, R., VALLADARES-PADUA, C. (Org). **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Paraná: UFPR, 2003. p. 395-422.

GIANNOTTI, E. **Composição florística e estrutura fitossociológica da vegetação de cerrado e de transição entre cerrado e mata ciliar da Estação Experimental de Itirapina (SP)**. 1988. 222p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

HEYWOOD, V.H.; IRIONDO, J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, Amsterdam, Elsevier, v. 113, p. 321-335, 2003.

HONSHO, C.; NISHIYAMA, K.; EIADTHONG, W; YONEMORI, K. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango (*Mangifera indica* L.). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, p. 152-154, 2005.

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

KREBS, C.J. **Ecological methodology**. California: Welsey Educational Publishers, 1999. 620 p.

LEGENDRE, P.; FORTIN, M.J. Spatial pattern and ecological analysis. **Vegetatio**, Netherlands, Springer, v. 80, p. 107-138, 1989.

LÓPEZ-NARANJO, H. J. **Estrutura morfológica de *Anacardium humile* A. St.-Hil. (Anacardiaceae)**. 1975. 80 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.

LÓPEZ-NARANJO, H.J.; PERNÍIA, N.E. Anatomia y ecología de los organos subterraneos de *Anacardium humile* A. St.-Hil. (Anacardiaceae). **Revista Forestal Venezolana**, Mérida, v. 24, p. 55-76, 1990.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 384 p.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 2006. 627 p.

LUDWIG, J.A.; REINOLDS, J.F. **Statistical ecology**: a primer on methods and computing. New York: John Wiley & Sons, 1988. 337 p.

MANTOVANI, W. **Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do Cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo**. 1983. 147p. Tese (Mestrado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1983.

MANTOVANI, W.; MARTINS, F.R. Florística do cerrado na Reserva Biológica de Moji-Guaçu - SP. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 7, p. 33-59, 1993.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. *WebSat* - A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformation**, Washington, v. 3, n. 6, p. 282-283, 2009.

MIRANDA-MELO, A.A. **Estrutura espacial de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. e *Roupala montana* Aubl. em quatro fragmentos de cerrado**. 2004. 113p. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ODEN, N.L. Assessing the significance of spatial correlogram. **Geographical Analysis**, Richardson, v. 16, p. 1-16, 1984.

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

PENHA, H.A. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites em *Passiflora alata* Curtis**. 2007. 92p Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2007.

PUPKO, T; GRAUR, D. Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 48, p. 313-316, 1999.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, p. 223-230, 1997.

REATTO, A.; MARTINS, É. de S. Classes de solo em relação aos controles da paisagem do

cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 439 p.

RICKLEFS, R.E. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 503 p.

ROSE, O.; FALUSH, D. A threshold size for microsatellite expansion. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 15, p. 613-615, 1998.

ROSENBERG, M.S. **PASSAGE: pattern analysis, spatial statistics and geographic exegesis**. Version 1.1. Department of Biology, Arizona State University, Tempe, 2001.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. *Primer3* on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ S, MISENER S (Eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. New Jersey: Humana Press, 2000. p. 365-386.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. Alguns aspectos sobre a paleoecologia do cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 439 p.

SCHNELL, R.J.; OLANO, C.T.; QUINTANILLA, W.E.; MEEROW, A.W. Isolation and characterization of 15 microsatellite markers from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 625-627, 2005.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Bethesda, v.130, p.457-462, 1995.

SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P. M.; WOODHEAD, M.; RUSSEL, J.; LOWE, A. J.; GIBBY, M.; POWELL, W. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 1339-1348, 2003.

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A.Y. **Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea ssp Leguminosae*) utilizando microssatélites**. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03pdf/03-007.pdf>. Acesso em: 27 out. 2008.

TANNUS, J.L.S.; ASSIS, M.A. Composição de espécies vasculares de campo sujo e campo úmido em área de cerrado, Itirapina-SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, p. 489-506, 2004.

VALE, F.X.R.do; FILHO, E.I.F.; LIBERATO, J.R. **Quant**. Versão 1.0.1. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

WEISER, V. de L.; GODOY, S.A.P. de. Florística em um hectare de cerrado *stricto sensu* na Arie – Cerrado Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 15, p. 201-212, 2001.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p. 1-16, 2002.

ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 929 p.

ZHU, Y.; STRASSMANN, J.E.; QUELLER, D.C. Insertions, substitutions and the origin of microsatellites. **Genetics Research**, London, v. 76, p. 227-236, 2000.