UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

MÁRCIA DUARTE BARBOSA DA SILVA

**Diversidade e Estrutura Genética Populacional de *Vellozia squamata*
Pohl sob diferentes frequências de fogo no Cerrado.**

São Paulo

Junho 2013

MÁRCIA DUARTE BARBOSA DA SILVA

Diversidade e Estrutura Genética populacional de *Vellozia squamata* Pohl sob diferentes frequências de fogo no Cerrado.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre.

Área de concentração: Ecologia de Ambientes Aquáticos e Terrestres.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Regina Pivello

VERSÃO REVISADA

Versão original encontra-se disponível na Biblioteca do Instituto de Biociências da USP e Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

Julho, 2013

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica

Silva, Márcia Duarte Barbosa

Diversidade e Estruturação Genética intrapopulacional de *Vellozia squamata* Pohl sob diferentes frequências de fogo no Cerrado / Márcia Duarte Barbosa da Silva; orientadora Profa. Dra. Vânia Regina Pivello.

-- São Paulo, 2013

80f. fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Área de concentração: Ecologia de Ambientes Aquáticos e Terrestres) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

1. Ecologia do Fogo. 2. Genética de Populações aplicada à Ecologia. 3. Velloziaceae. 4. *Vellozia squamata* Pohl. I. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Márcia Duarte Barbosa da Silva

Diversidade e Estruturação Genética
intrapopulacional de *Vellozia squamata*
Pohl sob diferentes frequências de fogo
no Cerrado.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Mestre.

Área de concentração: Ecologia de
Ambientes Aquáticos e Terrestres.

Aprovado em 04 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Regina Pivello

Assinatura:_____

Prof(a) Dr(a): Maria Aparecida Zucchi

Instituição: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA, Polo
Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Centro Sul

Prof. Dr.: Flávio Bertin Gandara

Instituição: Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, Departamento de Ciências Biológicas

DEDICATÓRIAS

Às minhas amigas **Joice lamara Nogueira, Renata Martins Belo e Thaís Nícia Azevedo** do Departamento de Ecologia, minhas companheiras de mestrado.

A todos os amigos e amigas do **Laboratório de Melhoramento e Diversidade Genética** com os quais pude compartilhar conhecimento e amizade.

Celebro a união da família.

Meu pai Claudinei Barbosa da Silva,

Meu irmão Carlos Eduardo Duarte Barbosa da Silva e

Minha tia Maria Aparecida Duarte.

Fomos apenas mãe e filha.

Você passando a mão em minha cabeça

nos momentos de tristeza e

sorrindo nas minhas alegrias.

E eu... amando a incondicionalmente.

Sempre.

AGRADECIMENTOS

À orientadora **Profa. Dra. Vânia Regina Pivello** pela oportunidade na realização do projeto.

À **Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi** por ter proporcionado todo suporte e apoio técnico e científico necessário para realização e conclusão do mestrado.

Ao **Prof. Dr. José Baldin Pinheiro** por ter concedido o uso do Laboratório de Melhoramento e Diversidade Genética no Departamento de Genética ESALQ-USP, ao apoio técnico e científico e no aconselhamento para conclusão da presente dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Ecologia em especial à **Vera Lucia Barboza Lima** e **Paulo César Fernandes** por ajudar em todos os momentos necessários.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** por ter concedido bolsa durante a realização do mestrado e financiamento para realização do projeto.

À **Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Brasília-DF por permitir o uso da área para realização do projeto.

SUMÁRIO

Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução	12
1.1. As savanas e sua relação com o Fogo	12
1.2. O Cerrado: savana brasileira	14
1.3. Influência do Fogo na Genética Populacional	17
1.4. Genética Populacional e Sistemas de Reprodução	19
1.5. O uso de marcadores moleculares em estudos genéticos	22
1.6. Parâmetros Genéticos Populacionais	27
2. Objetivos e Relevância do Trabalho	32
3. Material e Métodos	33
3.1. A Reserva Ecológica do IBGE – RECOR	33
3.2. O Projeto Fogo	34
3.3. Espécie estudada: <i>Vellozia squamata</i> Pohl (Velloziaceae)	36
3.4. Métodos	39
3.5. Análises Genéticas	40
3.6. Análise dos Dados	44
4. Resultados	45
4.1. Material Vegetal e Extração DNA Genômico	45
4.2. Desenho de Iniciadores e Otimização	48
4.3. Genotipagem da População Amostral de <i>Vellozia squamata</i> Pohl .	49

4.4. Resultados das Estimativas dos Parâmetros Populacionais	51
5. Discussão	58
6. Conclusões	62
7. Referências Bibliográficas	62
Anexo 1	70
Anexo 2	72
Anexo 3	73
Anexo 4	76

RESUMO

O Cerrado é considerado uma das savanas mundiais, onde as ocorrências de queimadas são comuns. Portanto, o fogo é um importante agente seletivo do meio, ou filtro ambiental, e tem grande influência na dinâmica ecológica e evolutiva de todos os organismos que lá habitam. Das espécies da fauna e flora endêmicas das savanas, muitas apresentam algum tipo de adaptação que favorece sua sobrevivência durante e após as queimadas. As queimadas naturais ocorrem sob os diferentes regimes de fogo, que compreendem: frequência - intervalo de tempo entre queimadas; intensidade - caracterizada pelo calor liberado na combustão; época - estação do ano; e tipo – conforme o estrato vegetacional predominantemente queimado, a direção do vento e a topografia local. Embora haja, na literatura, muitos estudos sobre os efeitos ecológicos do fogo nas savanas, estudos genéticos tendo o fogo como um importante agente seletivo são recentes. No Brasil, o único local em que se desenvolve um projeto de longo prazo para estudar a dinâmica dos regimes de fogo é na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília-DF. O local contém cinco parcelas permanentes, em que foram estabelecidos quatro diferentes frequências de fogo: três delas com queimas bianuais, uma com queimas quadrienais e uma preventiva contra fogo. Escolheu a espécie *Vellozia squamata* Pohl como modelo para averiguar a possível influência de diferentes regimes de fogo no nível genético. O estudo foi pautado na seguinte pergunta: A variabilidade e a estruturação genética para indivíduos de uma mesma população variam sob diferentes regimes de fogo? Hipóteses (1) A variabilidade genética não se altera com o regime de fogo e, (2) A estruturação genética não se altera com o regime de fogo. Para tanto, foram desenvolvidos 51 marcadores do tipo microsatélite para a espécie, dos quais dez foram utilizados na genotipagem da população amostral de *V. squamata*. Os resultados indicam que a diversidade é alta em todos os tratamentos ($\bar{H}_e = 0,79$) e há alta endogamia intrapopulacional ($\bar{F}_{IS} = 0,413$), o que sugere a ocorrência de autofecundação e/ou cruzamentos entre os indivíduos aparentados. A variabilidade estimada entre os tratamentos foi considerada intermediária ($\bar{F}_{ST} = 0,084$), indicando a existência de variação entre tratamentos e relacionado com a deriva genética. Assim como se verificou haver variabilidade devida a diferentes frequências de fogo entre os tratamentos, por meio de AMOVA (Análise de Variância Molecular). Os parâmetros genéticos populacionais estimados são importantes para inferir sobre a diversidade e estrutura genética da espécie e gerar subsídios para sua conservação, assim como responder como a diversidade e estrutura genética podem ser afetadas por diferentes frequências de fogo.

ABSTRACT

The Cerrado is considered one of the world's savannas, where fire occurrences are common. Therefore, fire is an important selective agent in the environment, or environmental filter, and has great influence on the ecological and evolutionary dynamics of all organisms that inhabit savannas. Several species of flora and fauna endemic to the savanna have some kind of adaptation to facilitate their survival during and after fires. Fires in savannas occur under different regimes, which comprise: frequency - time interval between fires; intensity - reflected by the heat released in the combustion; season – period of the year, and type – depending on the vegetation layer predominantly burned, wind direction and local topography. Although many ecological studies on fire in the savannas exist in the literature, genetic studies showing fire as an important selective agent are recent. In Brazil, the only place where a long-term project is developed to study the effects of fire regimes in fauna and flora is the Ecological Reserve of IBGE, Brasília-DF. The site contains five permanent plots where four different frequencies of experimental fires were established: three with biennial fires at different seasons, one with quadrennial fires, and a control with no fire. We chose the species *Vellozia squamata* Pohl to investigate whether there was variation in the genetic diversity, as well as the genetic structure of the population, due to different fire frequencies. The study was guided by the following question: Variability and genetic structure of individuals within a population vary under different fire regimes? Assumptions (1) genetic variability does not change with the fire regime, and (2) genetic structure does not change with the fire regime. We then developed 51 microsatellite markers for the species, of which 10 were used for genotyping the sample population of *V. squamata*. The results indicate that the diversity is high in all treatments ($\bar{H}_e = 0,79$ e $S\bar{H}_e = 0,04$) and there is a high inbreeding within populations ($\bar{F}_{IS} = 0,413$), suggesting the occurrence of self-fertilization and/or fertilization among related individuals. The estimated variability among treatments showed intermediate values ($\bar{F}_{ST} = 0,084$), indicating the existence of variation among treatments, related to genetic drift (subdivision of treatments). Results also showed the existence of variability due to different fire regimes by means of AMOVA (molecular analysis of variance). The genetic parameters here estimated are important to infer about the genetic diversity and structure of the species, and to generate subsidies for conservation, as well as to reveal effects of fire on the genetic level.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As savanas e sua relação com o Fogo

As savanas distribuem-se na zona tropical do globo e abrangem os continentes da América do Sul, Central e sul da América do Norte, África Central e Sul, Ásia e norte da Austrália (Pausas & Keeley 2009) (Figura 1). Em todos esses continentes, o fogo molda as paisagens savânicas de modo que a fisionomia vegetal é caracterizada por predominância de gramíneas, e arbustos e árvores em quantidades variáveis.

Figura 1: Mapa global da distribuição do fogo (Bond *et al.* 2005a). Em vermelho mais intenso corresponde às áreas de distribuição das plantas C₄, que coincide com a distribuição das savanas.

A existência do bioma savânico coincide com o aparecimento das gramíneas C₄. Essas gramíneas vivem sob temperaturas elevadas, apresentam alta eficiência fotossintética em meio com baixa disponibilidade de CO₂ e, portanto, alta produtividade. Em clima estacional – próprio das savanas – a parte aérea dessas gramíneas desseca na época seca e apresenta alta flamabilidade. O ciclo se forma: a vegetação rasteira gera o combustível para as queimas e essas, por sua vez, favorecem a permanência e a expansão das gramíneas, e assim sucessivamente.

Ou seja, devido a essa retroalimentação positiva de fogo e gramínea, ambos expandiram globalmente, originando as savanas. Outros tipos de plantas, como as arbustivas e arbóreas adaptadas a tal ciclo, também compõe as fitofisionomias savânicas atuais (Beerling & Osborne 2006; Osborne & Beerling 2006; Pausas & Keeley 2009; Edwards *et al.* 2010).

O fogo nas savanas, evolutivamente, pode ser considerado com um dos agentes seletivos, pois favorece indivíduos com atributos, ou características adaptativas, a ele relacionadas. Usualmente, tem-se como exemplos de atributos adaptativos às queimas a presença de órgãos subterrâneos – como xilopódio, rizoma, bulbo – com funções de reserva d'água e/ou de armazenamento de nutrientes minerais; súber espesso nos troncos e ramos das árvores, que funcionam como isolante térmico e proteção interna dos tecidos vivos; estruturas de proteção das gemas aéreas e/ou subterrâneas; brotos subterrâneos; espessamento do tegumento das sementes; e estratégias reprodutivas, como exposição dos órgãos reprodutores somente na estação úmida ou favorável; floração breve e sincronizada na população num curto período de tempo (Coutinho 1978, 1982, 1990; Eiten 1982).

Plantas que possuem estratégias de regeneração após distúrbios, como o fogo, usualmente são classificadas tanto como “rebrotadoras” (“resprouting”) ou “germinadoras” (“seeding”), além de serem facultativas ou obrigatórias (Verdú 2000; Bell 2001). As primeiras caracterizam-se por terem gemas em órgãos subterrâneos ou em caules, que permitem a rebrota pós-fogo. As segundas morrem durante ou após a queima, porém são capazes de produzir elevado número de sementes, que sobrevivem e/ou germinam após o fogo (Verdú 2000).

Atualmente, há um grande debate na literatura sobre a pressão seletiva do fogo na vegetação savânica. As características questionadas sobre seus valores adaptativos são: rebrotamento, dormência, florescimento pós-fogo, inflamabilidade, respostas tardias e germinação induzida pela fumaça. Bradshaw *et al.* (2011^a e 2011^b) consideram tais características como exaptações – termo atribuído por Gould e Vrba (1982) em que um atributo, ou características, aumentavam a aptidão em um determinado ambiente no passado, mas que não evoluiu por meio da ação da seleção natural para o ambiente atual. Nesse caso, outros fatores ambientais, por exemplo, solo pobre em nutrientes e água, teriam selecionado tais

características nas plantas, e não o fogo. A única exceção é para o florescimento pós-fogo e somente para plantas dependentes de fogo. Keeley *et al.* (2011) e Pausas & Schwilk (2012) contrariam as ideias do grupo anterior e chamam a atenção para o fato de as adaptações variarem em relação ao regimes de fogo. Isto é, as características adaptativas das plantas estão relacionadas a um determinado tipo de regime de fogo, como frequência, intensidade, padrões de consumo da biomassa.

Os três elementos necessários à existência de queimadas – combustível, comburente e energia, mais o clima seco – variam nas diferentes paisagens savânicas. Assim, as queimadas ocorrem em diferentes intensidades e frequências nas paisagens, o que leva a uma variedade de efeitos ecológicos (Bond & Keeley 2005; Whitlock *et al.* 2010). Intensidade, frequência, estação do ano e tipo de queimada caracterizam o que chamamos de regime de fogo. Essas características dependem de diversas variáveis, principalmente relacionadas ao tipo e quantidade de combustível, às características climáticas, à superfície e inclinação do terreno (Bond & Keeley 2005; Pausas & Keeley 2009).

Em uma comunidade, as plantas se distinguem quanto às estratégias de reprodução e sobrevivência face aos diferentes regimes de fogo, além de selecionarem determinados atributos adaptativos, descritos anteriormente. Isso sugere que o fogo seja um filtro ambiental e explique as diferentes fisionomias encontradas numa mesma região de savanas (Bond & Keeley 2005; Pausas & Keeley 2009; Keeley *et al.* 2011; Pausas & Schwilk 2012). Desse modo, pode-se supor que muitas plantas estão adaptadas a um tipo particular de regime do fogo, e deixar de entender tal particularidade pode impactar a sustentabilidade de muitos componentes do ecossistema savânico (Pausas & Keeley 2009).

1.2. O Cerrado: savana brasileira

A savana brasileira, ou Cerrado, pode ser definida como “complexo vegetacional que possui relações ecológicas e fisionômicas com outras savanas da América tropical e da África” (Embrapa Cerrados 2004; Klink & Machado 2005).

Conforme o último levantamento realizado pelo Ministério do Meio Ambiente em parceria com instituições públicas, o Cerrado ocupava originalmente uma área total estimada em 2.036.448 km², ou 23,92% do território nacional (IBGE 2004), que abrange as regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste (Figura 2).

Figura 2: Localização do bioma Cerrado. Em cinza é a área total estimada de 2.036.448 km², ou 23,92% do território nacional (IBGE 2004). Abrange o Distrito Federal (DF), Maranhão (MA), Piauí (PI), Tocantins (TO), Bahia (BA), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP) e extremo norte do Paraná (PR). Fonte: IBGE 2004.

No Cerrado, predomina o clima Aw no Brasil Central e, em menor escala CWa e CWb, em São Paulo e Minas Gerais (classificação climática de Köppen-Geiger, Kottek *et al.* 2006), sendo úmido no verão e seco no inverno, que se estende entre abril e setembro. Essa estacionalidade marcada favorece a ocorrência e propagação do fogo na época seca – principalmente as queimadas de origem humana – e na transição entre seca e início das chuvas, quando é grande a ocorrência de raios, no caso das queimadas naturais (Ramos-Neto & Pivello 2000). O período crítico de queimadas está entre os meses de agosto/setembro, quando a vegetação encontra-se muito seca e as condições meteorológicas favorecem sua propagação (Coutinho 1982 e 1990).

O Cerrado apresenta uma diversidade de formas vegetais e de fitofisionomias. As formas variam desde gramíneas, arbustos a árvores com dez metros ou mais, formando gradiente fitofisionômico descrito por Coutinho (1978 e 2006) como Cerrado “Sensu Lato”, que compreende desde formação campestre – campo limpo composto por vegetação rasteira; formações savânicas ecotonais – campo sujo, campo cerrado e cerrado *sensu stricto*, compostos por vegetação rasteira, arbustos e árvores esparsas que formam um dossel aberto; e formação florestal, cerradão, composto principalmente por árvores, que formam um dossel aberto.

Dentre as savanas mundiais, o Cerrado é considerado a de maior biodiversidade (Ratter *et al.* 1997; Mittermeier *et al.* 1998; Myers *et al.* 2000; Klink & Machado 2005). Ainda, a riqueza em espécies vegetais endêmicas do Cerrado está estimada aproximadamente em 44%, considerando-se apenas as espécies atualmente conhecidas. A família Velloziaceae é um exemplo desse elevado endemismo, com cerca de 70% das espécies sendo endêmicas do Cerrado (Machado *et al.* 2004). Apesar dessa grande biodiversidade, estima-se que pelo menos 50% do bioma foi transformado pelo homem (Klink & Machado 2005).

A relação do Cerrado com o fogo parecer ser muito antiga. Simon *et al.* (2009), por meio de estudos filogenéticos, admitem que várias linhagens de plantas adaptadas ao fogo apareceram entre 10 e 4 milhões de anos atrás. Muito depois, com a presença do homem, as queimadas foram intensificadas, pois o fogo passou a ser usado como instrumento de manejo desses ecossistemas. Há cerca de dez mil anos, as populações indígenas já ocupavam partes do Brasil Central (Prous 1992; Schmiz 1994; Cooke 1998). Eram caçadores-coletores e manejavam o fogo em sistema de rotação para produção agrícola de subsistência, ocupando diferentes regiões do Cerrado e influenciando as suas fitofisionomias (Coutinho 1982). Por volta do século XVII, o Domínio do Cerrado teve suas terras desflorestadas pelos colonos europeus devido à introdução da mineração, agricultura e pecuária. Desde então, o fogo passou a ser usado mais intensamente na agricultura, na pastagem e no desmatamento. Nas últimas décadas, o aumento da população brasileira, a expansão agrícola e pecuária se intensificou ainda mais o desmatamento e o uso do fogo no Brasil Central. Ainda, as ações humanas alteraram a época de ocorrência de queimas no Cerrado para o período de inverno (junho a setembro),

diferentemente da época de maior frequência das queimadas naturais causadas por raios (Ramos-Neto & Pivello 2000). Apesar da vegetação do Cerrado estar adaptada ou ser tolerante ao fogo, essa alteração no regime de queima pode alterar sua dinâmica e gerar desequilíbrio nas comunidades da fauna e flora do Cerrado (Coutinho, 1990; Salgado-Labouriau *et al.*; 1998; Pivello 2011).

1.3. Influência do Fogo na Genética Populacional

Há muito tempo tem-se estudado a ecologia do fogo através da composição florística, estrutura ecológica das comunidades, morfologia e anatomia, atributos funcionais de plantas, distribuição espacial, fisiologia, entre outros (Bond 2005; Coutinho 1978, 1982, 1990, 2006; Eiten 1982; Keeley 2011; Pausas & Keeley 2009; Warming 1892). Porém, só recentemente iniciaram-se estudos genéticos populacionais dos organismos que vivem em ambientes pirofíticos, com o propósito de se identificar e avaliar como o fogo mantém, sob seleção, tais organismos, e como as populações reagem devido a tal condição do meio (Schiller *et al.* 1996, Menges & Dolan 1998). Ao avaliar molecularmente os indivíduos, pode-se identificar aqueles com maior aptidão aos ambientes periodicamente queimados, através da herança parental, grau de parentesco, identidade genética. Pode-se também avaliar a estruturação e dispersão espacial das populações, identidade populacional, o tipo de seleção, entre outros temas.

Nos últimos anos, os estudos ecológicos apoiados em marcadores moleculares neutros ou associados a locos sob seleção vêm ganhando força, pois se pode ter um entendimento em fina escala de como os processos ecológicos, como o fogo, determinam a distribuição das populações naturais e sua estruturação ao longo do gradiente ambiental (Selkoe & Toonen 2006). Atualmente, a facilidade e os custos cada vez mais acessíveis do desenvolvimento de marcadores moleculares vêm estimulando os pesquisadores a usarem esse tipo de ferramenta, com a qual se podem gerar milhares de marcar moleculares com a finalidade para estudos ecológicos (Selkoe & Toonen 2006).

Alguns exemplos do uso de marcadores moleculares para responder questões sobre conservação de espécies e ecologia do fogo já são encontrados na

literatura. Collevatti *et al.* (2001) estudaram a estruturação genética, fluxo gênico e o sistema de reprodução de *Caryocar brasiliense* Camb., planta nativa do Cerrado e popularmente conhecida como pequi, para obter informações úteis na conservação da espécie, ameaçada pela fragmentação de seu habitat. Para tal, utilizaram marcadores genéticos do tipo microssatélites em dez populações de *C. brasiliense*. Os autores encontraram poucas evidências conclusivas quanto aos efeitos de perda de habitat e o seu uso exploratório, devido à espécie ter elevada expectativa de vida. Porém, os dados moleculares obtidos mostraram como a diversidade e a estruturação genética está distribuída nas populações, dado, este importante para a preservação da espécie em locais onde possa estar mais ameaçada de extinção. Barrett *et al.* (2005) estudaram a diversidade e estruturação genética de *Banksia hookeriana* Meisn., arbusto nativo da Austrália e comercializado como planta ornamental, com intuito de comparar o banco de sementes com os indivíduos adultos em uma área sob regime de fogo. Para tal usaram marcadores do tipo polimorfismo de com primário de fragmentos amplificados, ou AFLP. Os resultados indicaram que a maior parte da diversidade genética é mantida no banco de sementes. Dos parâmetros genéticos usados, esses indicaram que a diversidade genética se acumula rapidamente no banco de sementes chegando ao seu máximo em seis anos. Porém, após sete anos, a viabilidade das sementes cai pela metade e o modelo demográfico indica que a expectativa de vida do banco de sementes é cerca de oito anos. Desse modo, os autores propõe que intervalos de queimas de onze anos seria adequado para manter a variação genética na população estudada. E, tal estudo se mostra importante para o manejo do fogo já que as queimadas prescritas muito ou pouco frequentes podem se prejudiciais à espécie. Schrey *et al.* (2011) avaliaram o efeito do regime de fogo sobre a população de *Plestiodon reynoldsi*, uma espécie de um pequeno lagarto fossorial de vida longa que habita o centro do estado da Flórida e de distribuição restrita. Ao usar marcadores moleculares do tipo microssatélite, verificaram que em áreas de ocorrência de fogo natural a população mantém a diversidade genética. E, alta frequência de fogo, pode levar à maior diferenciação genética entre as populações locais.

1.4. Genética Populacional e Sistemas de Reprodução

Entende-se por População Genética, o conjunto de indivíduos que compartilham o mesmo “pool” gênico, ou seja, os genes são transmitidos para gerações futuras através da reprodução – hereditariedade. São características populacionais: frequência alélica e genotípica, variação genotípica e fenotípica – herdabilidade, taxa de mutação, taxa de cruzamento – fluxo gênico, tamanho populacional efetivo (Frankham 2002, Hartl 2006, Hamilton 2009 e Hedrick 2011).

Dentre os estudos da estrutura e diversidade de uma população genética, um dos principais modelos usado é do Equilíbrio de Hardy-Weinberg – EHW. As premissas de Hardy-Weinberg são: população infinita, acasalamentos ao acaso, igualdade entre o número de machos e fêmeas, casais são férteis e têm o mesmo número de prole, indivíduos diploides, com reprodução sexuada, ausência de migração, mutação e seleção natural. O modelo de EHW é robusto o suficiente, mesmo quando há violação de uma ou mais premissas na ausência de mutação, migração, deriva e/ou seleção natural (Conner & Hartl 2004). Desse modo, uma população está EHW quando suas frequências alélicas permanecem constantes através das gerações e se ocorrer ou não alterações nas frequências genotípicas. Porém, se houver alteração nas frequências alélicas, um novo equilíbrio será atingido após a primeira geração de cruzamentos ao acaso (Conner & Hartl 2004).

As variáveis em Genética Populacional são os alelos e os genótipos (Ridley 2004). A variação alélica, isto é o número de alelos por loco gênico, é um parâmetro importante em Genética de Populações, pois, a partir dele, se determinam as estimativas das frequências alélicas (ou gênicas) e genotípicas, taxas das heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e). Portanto, variabilidade genética é uma medida de ocorrência de alelos diferentes no mesmo loco gênico, com taxa de frequência alélica maior que um por cento em uma mesma população, ao que se denomina polimorfismo genético (Frankham 2002, Hedrick 2011).

Diversidade Genética é a variedade de alelos e genótipos representativos de uma população e entre populações diferentes que mantêm fluxo gênico, ou seja, metapopulação (Conner & Hartl 2004). A diversidade genética reflete as diferenças entre os indivíduos e entre os grupos de indivíduos. É descrita através do polimorfismo dos locos gênicos, média da heterozigosidade e pelo número médio de

alelos por loco – diversidade alélica ou gênica (Frankham 2002). Pode-se concluir que a variabilidade genética e, portanto, a diversidade genética, só é observada se houver variação alélica entre os indivíduos de uma população.

Os sistemas de reprodução têm efeito importante na estruturação e composição genética das populações. Podem ocorrer os seguintes tipos de reprodução: autógama ou autofecundação; alógama ou reprodução cruzada; sistema misto – autógamo e alógama; apomítica ou apomixia e; apomítica parcial – alógama e assexuada (Hamrick 1982, Loveless & Hamrick 1984, Kearns & Inouye 1993). Em plantas, o sistema sexual pode ser hermafrodita (flores monóclinas ou bissexuais), monóico e dióico (flores díclinas). Plantas polígamas apresentam flores monóclinas e díclinas no mesmo indivíduo (Karasawa 2009).

Ploidia é o número de cópias do genoma existentes em um indivíduo, população ou espécie, sendo representado pela letra “n” (por exemplo, haploide: $1n=10$; diploide: $2n=20$ e assim por diante). No reino vegetal, a variação da ploidia é comum e ocorrem muitos casos de híbridos em que seus genitores são de ploidias diferentes. O conhecimento da ploidia é de fundamental importância na escolha de um marcador genético apropriado para estudos populacionais, além de permitir inferências sobre a ocorrência dos processos genéticos e evolutivos de uma população.

Outras variáveis ecológicas que afetam a estrutura populacional em plantas, tais como: morfologia floral, mecanismo de polinização, dispersão de sementes, dormência de sementes, fenologia, ciclo de vida, período de reprodução e estágio sucessional, não serão tratadas no presente estudo (Hamrick 1982, Loveless & Hamrick 1984).

Estruturação genética é a distribuição não aleatória dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, e sua organização no genoma está relacionada aos processos celulares que afetam as frequências alélicas e genotípicas (Loveless & Hamrick 1984) nucleares, mitocondriais, plastidiais. A estrutura genética populacional é descrita através da diversidade gênica, modelos espaciais de fluxo gênico e estatísticas de diversidade: estatística-*F* de Wright (1965), análise de diversidade gênica de Nei de populações subdividas (1977), coeficiente de

coancestralidade de Cockerham (1969) e medidas de subdivisão da população, baseadas nas frequências alélicas de SSR (Slatink 1995).

Nas populações de plantas, alelos e genótipos estão estruturados no espaço e tempo. A estruturação genética pode se apresentar entre populações de uma mesma espécie geograficamente distintas, entre populações locais de uma mesma região geográfica e dentro de uma mesma população ou progênie. Tais modelos de estruturação resultam de processos evolutivos, em maior ou menor grau, como mutação, fluxo gênico – intercâmbio de alelos entre grupos, seleção, ou deriva genética, que operam dentro da história de vida das plantas. Para plantas, os fatores ecológicos que influenciam na estruturação são a reprodução e dispersão de pólen e sementes. Por possuírem mobilidade espacial limitada, a estrutura genética pode ser correlacionada à estruturação espacial das populações. Porém, tal correlação pode não ser sempre verdadeira, pois a distribuição dos indivíduos no espaço e sua diversidade genética não são aleatórias, devido aos processos evolutivos, história de vida da espécie (Loveless & Hamrick 1984), interações ecológicas, dentre outros.

Em resumo, os fatores evolutivos que levam à estruturação da variação no nível populacional são a deriva genética, mutação e seleção – que aumentam a variação – e fluxo gênico, que diminui a variação, tendendo a homogeneizar a população. Os modelos de estruturação populacional relacionadas à distribuição da variação genética estão representados na Figura 3.

Em relação aos indivíduos, a variação genética aumenta ou diminui devido ao tipo de sistema de reprodução (Wright 1951). Plantas alógamas têm menor variação entre populações do que plantas autógamas. As plantas alógamas possuem genótipos semelhantes dentro de populações, pelo mecanismo reprodutivo de autogamia (Pop2, Figura 3). Já as alógamas, possuem variação entre e dentro de populações (Pop1 e Pop3, Figura 3).

Figura 3: Modelos de estruturação da variação genética na população: Pop 1: ausência de estruturação entre os grupos, uma única população; Pop 2: variação genética organizada em grupos distintos, subpopulações; Pop 3: variação organizada entre e dentro dos grupos, subpopulações (Zucchi 2002).

1.5. O uso de marcadores moleculares em estudos genéticos

A marca de um único loco pode ser considerada uma amostra do genoma (Hedrick 2011). Devido à recombinação, seleção e deriva genética, regiões do genoma acumulam pequenas variações nas suas histórias genealógicas. Marcadores moleculares ou genéticos são regiões específicas de genomas, isto é, locos, usados na identificação dos organismos. Tais marcas são úteis no estudo da herança genética e identificação de fenótipos moleculares e podem estar associados a locos codantes (região de expressão dos genes) e não-codantes. Os marcadores são usados na determinação de grupos de ligação gênica, eventos de recombinação e mutação, identificação de uma região cromossômica específica, identidade de indivíduos e populações de qualquer organismo, através das diferenças alélicas de um ou mais locos. Um marcador genético segue as premissas: da herança mendeliana, ser neutros ou quase neutros, e atendem às premissas do Equilíbrio de Hard Weinberg (EHW).

Um dos primeiros tipos de marcador molecular com amplo uso para estudos genéticos populacionais foram as isoenzimas, na qual Robert L. Hunter e Clement L. Markert, em 1957, desenvolveram a técnica que permitira o seu uso na identificação das variantes enzimáticas, isto é, variantes proteicas oriundas dos locos gênicos, existentes em um mesmo indivíduo (Hunter & Markert 1957; Markert 1975). Hoje, usa-se a palavra isoenzima para enzimas de diferentes locos gênicos, e aloenzimas,

para o produto gênico de diferentes alelos de um mesmo loco gênico (Markert 1975; Schlötterer 2004).

Com os avanços das descobertas na genética molecular, surgiram outros marcadores genéticos mais informativos e identificados diretamente no genoma. O primeiro marcador relacionado diretamente com os locos gênicos foi o RFLP, “restriction fragment length polymorphism”, utilizado em 1974 para o mapeamento físico de mutações (Sambrook *et al.* 1974; Botstein *et al.* 1980). Esse tipo de marcador permitiu a realização de análises em regiões do DNA não-codante e locos de mutação silenciosa (Schlötterer 2004). Em 1980, Wyman e White publicaram sobre locos altamente polimórficos de DNA humano, que resultavam de rearranjos no DNA e estavam consistentes com a primeira Lei de Mendel. Após essa publicação, seguiram-se outros marcadores relacionados a esses locos altamente variáveis: os minissatélites, que constituem a técnica “DNA fingerprinting”, foram descritos por Jeffreys *et al.* (1985) e são ainda amplamente usados em testes de paternidade e genética forense (Gill *et al.* 1985). Porém, seu uso não se aplica para estudos populacionais e mapeamento genômico, devido à limitada distribuição não-aleatória dos minissatélites no genoma (Schlötterer 2004) e dificuldade de aplicação da técnica.

Até então, a identificação dos marcadores moleculares exigia grandes quantidades de DNA (Southern 1975), até que, em 1983, Mullis apresentou a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, “Polymerase Chain Reaction - PCR” (Saiki *et al.* 1985; Mullis 1990), que consiste na amplificação em grandes quantidades de fragmentos do DNA da região de interesse. Isso abriu as portas para a era dos marcadores moleculares baseados na PCR (Schlötterer 2004), dos quais o microssatélite foi o primeiro (Tautz 1989; Schlötterer 2004). Condit e Hubbell (1991) foram os primeiros a caracterizar microssatélites em plantas. Posteriormente, outros marcadores baseados na PCR surgiram: (a) “Randomly Amplified Polymorphic DNAs”, RAPD; (b) “Inter Simple Sequence Repeats”; (c) Inter Simple Sequence Repeat, ISSR; (d) “Inter Retrotransposon Amplified Polymorphisms”, IRAP; (e) “Amplified Fragment Length Polymorphisms”, AFLP (Schlötterer 2004). Nos anos 2000, com o desenvolvimento de sequenciadores automáticos, novos tipos de marcadores moleculares surgiram, como os “Single Nucleotide Polymorphisms”, SNP. Tais sequenciadores também permitem o sequenciamento

de genomas inteiros ou fragmentos com mais de mil pares de bases (kpb), o que possibilitou a identificação de mais de um tipo de marca e seu uso combinado com diferentes marcadores em um único resultado de sequenciamento.

Pode-se concluir que existem três grupos de marcadores moleculares: (i) de variantes proteicas, por exemplo, as aloenzimas; (ii) sequências polimórficas do DNA, por exemplo, RFLP e AFLP; e (iii) variantes repetidas do DNA, por exemplo, os minissatélites e microsatélites (Schlötterer 2004). Também podem ser agrupados quanto ao conceito de dominância alélica: marcadores dominantes ou multilocos, que são aqueles em que somente os indivíduos homozigotos podem ser identificados, e a variabilidade é medida através da presença ou ausência de alelos em múltiplos locos gênicos como exemplos RAPD, AFLP, ISSR; marcadores codominantes ou de loco único, em que os homozigotos e heterozigotos são identificados e a variabilidade é medida no número de alelos presentes em um único loco gênico como exemplos aloenzimas, RFLP, SSR.

Microsatélites

Os microsatélites constituem sequências simples de nucleotídeos repetidos em tandem – isto é, unidades sequenciais em linha, um após outro, e em uma única direção – composto por um a seis motivos de pares de base (Tabela 1). Apresentam comprimento de até aproximadamente cem pares de bases (100 pb), distribuídos no genoma. São encontrados principalmente nos eucariotos e, em menor quantidade, nos procariotos e eubactérias (Tautz & Renz 1984; Tautz 1989; Li *et al.* 2002). O microsatélite também é nomeado como: Simple Sequence Repeats (SSR) ou Short Tandem Repeats (STR). Por ser altamente polimórfico, ter distribuição aleatória e estar presente nas regiões codantes e, principalmente, não-codantes do genoma, é considerado um tipo de marcador altamente qualificado para estudos genéticos populacionais, mapeamento gênico e identificação de indivíduos (Tautz & Renz 1984; Tautz 1989; Li *et al.* 2002; Schlötterer 2004), pois, seguem as leis de herança mendeliana, EHW e a Teoria Neutra. O SSR pode ser classificado de acordo com o tipo do motivo: mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e exa-nucleotídeo e pelo tipo de sequência: perfeito, imperfeito, composto, interrompido (Tabela 1) (Oliveira *et al.* 2006).

Tabela 1: Classificação dos tipos de microssatélites em relação ao motivo e sequência em que aparecem em um dado loco gênico. O índice 'n' subscrito indica o número vezes em que a repetição (ou motivo) aparece. Na terceira coluna apresenta o modelo de representação do SSR (conforme Oliveira et al. 2006).

Motivo		Sequência SSR		Representação
Mono	(A) _n	Perfeito	ACACACACACACACACAC	(AC) ₉
Di	(AC) _n	Imperfeito	ACACACAC TT ACACACAC	(AC) ₄ TT(AC) ₄
Tri	(ATT) _n	Composto	ATTATTATT ACACACACAC	(ATT) ₃ (AC) ₅
Treta	(AACT) _n	Interrompido	ACACACT AGGCT ACACAC	(AC) ₃ ...(AC) ₃
Penta	(GACCT) _n	---	---	---
Hexa	(GGACCT) _n	---	---	---

O alto grau de polimorfismos encontrado no SSR pode ser explicado por duas vias de origem no genoma. A primeira é por erro de pareamento durante a replicação do DNA, ou *slippage* da polimerase. As variações dos números repetidos de motivos, ou de nucleotídeos, se devem ao deslizamento incorreto nos filamentos de DNA durante a replicação. Os sistemas de reparo, durante a duplicação do DNA, revisam o novo segmento duplicado e, se detectado o erro, esse é corrigido por reparação exonucleolítica. Porém, os sistemas de reparo eventualmente falham e novos nucleotídeos permanecem incorporados ou excluídos após a duplicação (Li *et al.* 2002; Ellegren 2004; Oliveira *et al.* 2006). Nucleotídeos de sequências repeditas em tandem são os mais comuns em gerar novas mutações, pois os sistemas de reparo do DNA durante a duplicação são incapazes de reconhecer eficientemente erros dos segmentos de nucleotídeos repetidos em tandem (Goldstein & Schlotterer 1999, Ellegren 2004). A segunda via é por recombinação cromossômica, na qual pode ocorrer, durante a meiose, o pareamento desigual dos cromossomos homólogos durante a permutação gênica, ou por conversão gênica durante a duplicação cromossômica (Li *et al.* 2002; Ellegren 2004; Oliveira *et al.* 2006).

Ao considerar o uso de SSR para estudos genéticos populacionais, quatro modelos teóricos são aplicados. Os modelos provêm do número esperado de alelos em uma população de heterozigosidade observada e nas análises das estatísticas de diversidade (Oliveira *et al.* 2006).

- **Modelo Alelos Infinitos (“Infinite Allele”, IA):** Cada mutação aleatória gera um novo alelo. Em SSR, cada nova mutação altera o número de repetições.

- **Modelo de mutação passo-a-passo (“Stepwise Mutation”, SM):** Uma mutação em um loco de SSR pode levar ao ganho ou perda de repetições. Quando dois alelos se diferenciam por um único motivo, eles estão mais relacionados entre si do que alelos que diferem em vários motivos, isto é, o grau de relação com o ancestral comum mais recente.

- **Modelo Duas fases (“Two Phase”, TP):** Relaciona-se ao modelo SM, em que a maioria das mutações em locos de SSR é de perda ou ganho de um único motivo. Porém, podem ocorrer em menor frequência, alterações de um grande número de repetições.

- **Modelo K-alelos (“K-alleles”, KA):** Presume-se a existência de k alelos possíveis em um loco, de modo que a probabilidade de mutação de um determinado loco segue a equação $\mu^*(k-1)^{-1}$, em que μ é a taxa de mutação.

O uso do marcador genético SSR possui uma série de vantagens nos estudos ecológicos. Em primeiro lugar não há necessidade de grandes quantidades de amostras do material biológico por indivíduo, além de não ser um método invasivo para animais, permitindo o uso de material genético obtido da pele, pelos, penas e outros tecidos de animais vivos ou mortos, ou mesmo fezes. Para plantas, basta obter um pedaço de tecido vivo ou morto (folha, raiz, semente, flor, câmbio de árvore) com conteúdo celular. Se armazenado corretamente, o material vegetal pode ser usado em análises futuras (Selkoe & Toonen 2006).

Uma vez obtido o material genômico da espécie de interesse, os estudos com SSR podem ocorrer de diferentes formas, por exemplo, através da construção de uma biblioteca genômica contendo SSR da espécie de interesse, ou através da transferência de SSR, utilizando marcadores disponíveis na literatura e/ou bancos de dados moleculares (como o GenBank®), para a mesma espécie, ou gênero/família próxima. Apesar dessa última possibilidade, o SSR é considerado espécie-específico (Oliveira *et al.* 2006; Selkoe & Toonen 2006).

Nos estudos genéticos populacionais, a escolha de um marcador apropriado tem grande importância. Ao se considerar o tempo de gerações (10-100 gerações),

o tamanho populacional, deriva genética, efeito gargalo, fluxo gênico, demografia, ou modelos de conectividade das populações ecológicas, faz-se necessário o uso de um marcador genético multialélico e polimórfico. SSR atende a tais requisitos, pois geralmente apresenta elevadas taxas mutacionais, o que resulta em diversidade alélica, apresenta codominância, além ter seletividade neutra. Outra utilidade importante do SSR é conferir uma identidade genética única para cada indivíduo de uma população, o que eleva estatisticamente o poder distinção e comparação entre e dentro de populações (Selkoe & Toonen 2006).

1.6. Parâmetros Genéticos Populacionais

Diversidade Genética Populacional

As taxas frequências alélicas para organismos diploides (2n) são calculadas a partir da equação abaixo.

$$freq\ alélica = \frac{total\ de\ alelos}{2 \times tamanho\ populacional} = \frac{A_n}{2 \times N} \times 100$$

A taxa de frequência genotípica de um dado genótipo é calculada a partir da equação do EHW, para dois ou mais alelos:

$$freq\ genotípica = (A_p + A_q + \dots + A_n)^x = 1 \times 100$$

onde, $A_p, A_q, \dots, A_n$ são as taxas das frequências alélicas. O expoente x corresponde ao número de cópias do alelo no genoma. Para obter a taxa das frequências genotípicas multiplica-se por 100.

A heterozigosidade observada (H_o) e a heterozigosidade esperada (H_e) são calculadas a partir da equação (b), tendo:

$$H_o = \frac{número\ de\ heretozigotos}{número\ total\ de\ indivíduos\ da\ população}$$

$$H_e = 1 - \sum (frequencia\ de\ homozigotos)$$

Índice de fixação ou Coeficiente de Endogamia de Wright (f)

O coeficiente de endogamia de Wright, ou índice de fixação (f), é a probabilidade de dois alelos homólogos em um mesmo indivíduo serem idênticos por descendência (Wright 1922, Hedrick 2011). A equação do índice de fixação é a seguinte:

$$f = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

Quando o valor de: f = zero, o loco está em HWE; f > zero, há carência de heterozigotos; f < zero, há excesso de heterozigotos (seleção para o hetero); f = 1, ocorre ausência completa de heterozigotos.

Estrutura Genética

Análise Bayesiana

O Teorema de Bayes é a relação entre a probabilidade *a priori*, ou seja, obtida do resultado dos dados observados, estar ligada à probabilidade condicional, sendo esta obtida a partir da hipótese dos dados observados. A probabilidade *a priori* condicionada é denominada probabilidade *a posteriori* condicional (Beaumont e Rannala 2004). Os dados são as variáveis observadas (alelos e genótipos) e os parâmetros são as variáveis não observadas (hipótese dos dados observados), calculados pela média, moda ou mediana da distribuição posterior. Desse modo, na estatística bayesiana faz-se inferência sobre os parâmetros ou probabilidades de um determinado modelo com base nos dados observados, ou seja, como as probabilidades *a priori* podem ser alteradas considerando-se novas evidências, de forma a obter probabilidades *a posteriori*. (Beaumont e Rannala 2004).

No programa Structure (Pritchard *et al.* 2000), a estruturação populacional é baseada nas estatística bayesianas e no método de Monte Carlo em Cadeia de Markov, ou MCMC, em que as inferências demográficas aplicadas ao método são baseadas em simulações espaciais de processos estocásticos (Cadeia de Markov). A Cadeia de Markov gera uma série de variáveis aleatórias em que a probabilidade de distribuição do estado futuro é completamente determinada pelo estado atual, em

qualquer ponto da cadeia. Portanto, o MCMC é a construção da Cadeia de Markov com uma distribuição estacionária na probabilidade de distribuição de interesse e no qual, posteriormente, se faz inferência sobre o estado (Beaumont e Rannala 2004).

Estatísticas-*F* de Wright

As estatísticas-*F* estimam a distribuição da variação genética das populações, subdivididas no espaço e tempo, isto é, descrevem as propriedades hierárquicas na subdivisão das populações naturais (Wright 1965). A subdivisão da população é estimada em três níveis: na população total (*T*), nas subpopulações (*S*) e nos indivíduos (*I*). O F_{IT} é a correlação da união dos gametas produzidos pelos indivíduos em relação ao total de gametas produzidos na população. F_{IS} é a média global das subdivisões, correlacionada à união de gametas de cada subpopulação em relação à sua própria subdivisão. F_{ST} é a correlação da aleatoriedade dos gametas dentro das subdivisões em relação ao total dos gametas na população (Wright 1965). Em resumo, os parâmetros das estatísticas-*F* são: F_{IT} , endogamia total; F_{IS} , endogamia devido ao sistema reprodutivo; e F_{ST} , mede a diferenciação entre grupo de indivíduos endogâmicos devido à deriva.

Equação geral das estatísticas-*F* (Wright 1965, Hamilton 2011):

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS})$$

Equações para cada um dos índices de fixação de Wright seguido das equações dos índices (Wright 1965, Hamilton 2011):

$$F_{IT} = \frac{\bar{H}_S - \bar{H}_I}{\bar{H}_S} \quad F_{ST} = \frac{\bar{H}_T - \bar{H}_S}{\bar{H}_T} \quad F_{IT} = \frac{\bar{H}_T - \bar{H}_I}{\bar{H}_T}$$

$$\bar{H}_I = \frac{\text{média da heterozigosidade observada}}{\text{número de indivíduos da subpopulação}}$$

$$\bar{H}_S = \frac{\text{média da heterozigosidade esperada das subpopulações}}{\text{número de indivíduos por subpopulação}}$$

$$\bar{H}_T = \text{média heterozigosidade esperada total da população}$$

Para $\bar{H}_S$, assume-se o encontro aleatório dos gametas nas subpopulações e $\bar{H}_T$, assume-se encontro aleatório dos gametas dentro das subpopulações e não há divergência das frequências alélicas entre as subpopulações.

Os valores para F_{ST} variam de zero a 1, sendo que $F_{ST} = 0$ indica ausência de diversidade genética entre grupo de indivíduos e $F_{ST} = 1$, a fixação de alelos em diferentes subpopulações. Para valores intermediários de diferenciação genética, tem-se: 0 a 0,05 baixa; 0,05 a 0,15 moderada; 0,15 a 0,25 alta; e maior que 0,25 muito alta – considerando um indivíduo panmítico.

AMOVA

Análise Molecular da Variância, ou AMOVA, é análise hierárquica de variância molecular que avalia a quantidade de estrutura genética populacional em diferentes níveis: dentro dos indivíduos, dentro das populações, dentro de grupos de populações, entre grupos (Excoffer & Lischer 2010). Os cálculos em AMOVA baseiam-se em uma matrix de distância Euclidiana par a par entre todos haplótipos de múltiplos locais e arquivos que possuem a frequências desses haplótipos em cada população (Michalakis & Excoffer 1996). A informação sobre as diferenças no conteúdo de alelos entre haplótipos é inserida como uma matriz de distâncias euclidianas ao quadrado. Os componentes covariância associada com os diferentes níveis possíveis de estrutura genética são testados ao usar procedimentos de permuta não-paramétricos (Excoffier *et al.* 1992, Michalakis & Excoffer 1996, Meirmans 2006).

Diversidade Genética e Distância Genética (D) de Nei

Nei (1973 e 1977) define diversidade genética para um único loco como a heterozigosidade esperada em EHW, desconsiderando a frequência genotípica atual da população. Portanto, a diversidade genética de Nei mede o quanto de variação gênica existe nas populações em EHW, sem relação com a frequência de heterozigotos:

$$1 - J_S = (1 - J_T)(1 - G_{ST})$$

J : é a diversidade genética e identidade genética; J_S : é a média da diversidade genética dentro das subpopulações; J_T : é a diversidade genética total da população; G_{ST} : é a média da diversidade genética entre as subpopulações e da comparação das populações entre si.

Equação da diversidade total da população, J_T ou H_T :

$$J_T = H_T = D_{ST} + H_S$$

onde, H_T : diversidade total; D_{ST} : é a diversidade entre as populações; H_S : é a diversidade dentro das populações.

Equação da diversidade genética entre as subpopulações, G_{ST} :

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T} = \frac{\text{diversidade genética entre as populações}}{\text{diversidade genética total}}$$

$\bar{x}$ é a média e σ_x^2 é a variância da frequência do alelo entre as populações.

O valor de G_{ST} mostra o quanto as populações divergem. Os valores variam entre zero (iguais) e um (total divergência). Valores negativos podem representar erro de amostragem ou genotipagem.

A distância genética de Nei (1972) é o número efetivo de polimorfismo dentro das populações, normalizado pela identidade gênica entre as populações, e está relacionada ao número acumulado de diferentes genes por loco. A distância genética também é aplicada a populações pequenas e com um número razoável de locos para estudos (Nei 1978):

$$D = -\log_e I$$

D mede o acúmulo de substituições gênicas por loco e I é a identidade genética entre duas populações de um único ou todos os locos. Quando $D = 0$ e $I = 1$, as duas populações têm frequências alélicas iguais e quando $D = 1$ e $I = 0$, as populações não apresentam alelos em comum.

2. OBJETIVO E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Em ambientes submetidos a mudanças, uma alta diversidade genética é fundamental, pois permite adaptações e, portanto, a sobrevivência da população. Por isso, a caracterização da diversidade genética em populações é essencial para a compreensão dos processos evolucionários que causam heterogeneidade nas espécies; é particularmente importante sob o ponto de vista conservacionista (Vali *et al.* 2008). No Cerrado, as queimadas tendem a ocorrer em intervalos de três a quatro anos, nas fisionomias mais abertas e herbáceas, e em intervalos maiores nas fitosionomias mais fechadas lenhosas (Coutinho 1978 e 1990; Eiten 1978; Pivello & Coutinho 1992).

Vellozia squamata Pohl (canela-de-ema) é uma espécie endêmica do Cerrado e que se distribui por um gradiente de fitofisionomias, porém com populações mais adensadas nas fisionomias abertas (Oliveira *et al.* 1991) e apresenta características de plantas que vivem em ambientes pirofíticos: rebrotamento pós-fogo, folha coriácea, atividade reprodutiva na estação úmida e pós-queimas (Eiten 1972 e 1982; Coutinho 1990). Escolhemos essa espécie para avaliar possíveis influências de diferentes regimes de queima na sua estruturação populacional e na diversidade genética.

Assim, o presente estudo teve por finalidade inferir sobre o efeito de regimes de fogo distintos na estrutura e na diversidade genética das populações de *V. squamata*, expostas a diferentes frequências e épocas de queima, a partir da estimativa de parâmetros populacionais. O trabalho baseou-se na seguinte pergunta: “A variabilidade e a estruturação genética para indivíduos de uma mesma população variam sob diferentes frequências de fogo?”. Duas hipóteses principais foram formuladas: a) A variabilidade genética não se altera em diferentes

frequências de fogo; b) A estruturação genética não se altera em diferentes frequências de fogo.

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- o desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida com SSRs visando desenvolver marcadores moleculares para *V. squamata*
- determinar a variabilidade e a estruturação genética das populações de *V. squamata* em tratamentos com diferentes frequências de fogo
- averiguar se os parâmetros populacionais variam com as diferentes frequências de fogo.

Um dos maiores problemas relacionados ao manejo de parques e reservas ecológicas que visam à proteção do Cerrado diz respeito ao fogo. Não existe consenso entre os administradores dessas unidades de conservação e tampouco entre os órgãos ambientais por elas responsáveis sobre a admissão ou a manutenção do fogo nesses ecossistemas (Pivello 2005). As informações aqui geradas serão importantes para avaliar o potencial papel do fogo na variabilidade das plantas do Cerrado e, assim, subsidiar cientificamente ações de manejo em unidades de conservação para a proteção da biodiversidade em tais ecossistemas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. A Reserva Ecológica do IBGE - RECOR

A Reserva Ecológica do IBGE, ou RECOR possui 1.360 ha de área e está localizada a 26 km ao sul do centro de Brasília, sob as coordenadas 15°55'-15°58'S e 47°52'-47°55'W, em altitudes variando de 1.048 a 1.160 m. Juntamente com a Fazenda Água Limpa e o Jardim Botânico, formam a Área de Proteção Ambiental Gama-Cabeça de Veado, somando aproximadamente 10.000 ha. As fitofisionomias presentes são: campo sujo, campo cerrado, cerrado *sensu stricto* e cerradão. Predominam na RECOR os Latossolos, havendo algumas localidades com outros tipos de solo. As médias de temperatura e precipitação anuais na RECOR são de 20,8°C e 1.436 mm, respectivamente (Pivello *et al.* 2010; RECOR 2013).

3.2. O Projeto Fogo

O Projeto Fogo, sob o título de “Efeitos de diferentes regimes de queima sobre a estrutura das comunidades de Cerrado”, é um projeto de longa duração implantado na RECOR, que visa a entendimento dos efeitos de diferentes regimes de fogo sobre a estrutura e dinâmica da fauna e flora do Cerrado, além de possíveis efeitos no meio físico, a fim de melhorar ou desenvolver novos métodos de manejo com fogo no Cerrado. O Projeto iniciou em 1989 e, após 20 anos de queimadas prescritas, encontra-se atualmente sem receber queimas, o que ocorrerá por 20 anos, com o propósito de se averiguar a recuperação da fauna e flora local após o longo período de queimas prescritas (RECOR 2013).

O programa de queimadas experimentais foi implementado em fitofisionomias de cerradão e em campo sujo, tendo a primeira queimada prescrita experimental sido feita em agosto de 1991. Antes do início do projeto, a área estava protegida do fogo desde 1975 (Tabela 2).

O presente estudo foi realizado nas parcelas com fisionomia de campo sujo. Nessa fisionomia, foram delimitadas cinco parcelas de 200 m x 200 m (Figura 4), submetidas a um dos seguintes regimes de queima:

- **Bienal Precoce (BP):** queimadas prescritas em meados de junho, a intervalos de dois anos. Em manejo ecológico, esse regime de queima seria indicado para diminuir a biomassa combustível no pico da estação seca, para estimular a rebrota vegetal herbácea e disponibilizar alimento para a fauna na época seca.

- **Bienal Modal (BM):** queimadas prescritas em meados de agosto, a cada dois anos. É considerado o regime de queimas predominante no Cerrado (Coutinho 1990).

- **Bienal Tardia (BT):** queimadas prescritas em meados de setembro, a cada dois anos. Considerado o regime de fogo de maior impacto, devido ao padrão fenológico da vegetação, que apresenta pico de renovação das copas e reprodução durante a primavera.

- **Quadrienal Modal (QM):** queimadas prescritas em meados de agosto, a cada quatro anos. Esse intervalo maior de tempo entre queimas poderia favorecer o recrutamento e a regeneração de árvores entre as frequências de fogo regulares.

- **Controle (C) ou Sem queima:** ausência de queimadas, procedimento geralmente adotado nas unidades de conservação.

Figura 4: Área do Projeto Fogo, em campo sujo. Biental Precoce (BP); Biental Modal (BM); Biental Tardia (BT); Quadrienal Modal (QM); e Controle (C). Controle Externo (CE), não faz parte do Projeto. Das cinco parcelas, aquela com coloração enegrecida mostra uma queima prescrita do tratamento Biental Precoce. Data da foto: 17.07.2004 (Google Earth 2013).

A Tabela 2 apresenta os tratamentos e respectivas datas das queimadas prescritas realizadas.

Tabela 2: Queimadas prescritas realizadas em campo sujo, na Reserva Ecológica do IBGE (comunicação pessoal, Betânia Goes). O tratamento Controle (ausência de queimada) não se encontra na tabela.

Tratamentos			
Bienal Precoce	Bienal Modal	Bienal Tardia	Quadrienal Modal
---	---	---	Agosto de 1991
08.06.1992	11.08.1992	15.09.1992	---
---	---	---	1 ^a de agosto 1993
06.06.1994	15.08.1994	26.09.1994	---
---	---	---	14.08.1995
19.06.1996	13.08.1996	16.09.1996	---
22.06.1998	10.08.1998	22.09.1998	---
---	---	---	12.08.1999
19.06.2000	14.08.2000	21.09.2000	---
24.06.2002	12.08.2002	23.09.2002	---
---	---	---	11.08.2003
14.06.2004	02.08.2004	28.09.2004	---
05.07.2006	28.08.2006	26.09.2006	---
---	---	---	03.09.2007
16.06.2008	27.08.2008	24.09.2008	---

Durante esse período (desde 1989), alguns incêndios acidentais ocorreram na área da RECOR e atingiram o Projeto Fogo na fisionomia de campo sujo (comunicação pessoal, Betânia Goes): 14.08.1994, incêndio próximo à portaria; 02 a 04.10.1994, grande incêndio que atingiu aproximadamente 80% da área da RECOR; 07.07.1998, Incêndio próximo à portaria; 19 a 22.09.2005, grande incêndio que queimou praticamente metade da área da RECOR; 07 a 10.09.2011, grande incêndio na APA Gama Cabeça de Veado. Quase 100% da área da RECOR foi incendiada; sendo que apenas três tratamentos do Projeto Fogo, em fisionomia de cerrado *sensu stricto*, e o entorno dessas parcelas não foram queimados.

3.3. Espécie estudada: *Vellozia squamata* Pohl (Velloziaceae)

Velloziaceae é uma família de plantas com aproximadamente 250 espécies tropicais, distribuídas em quatro gêneros. Seus membros são característicos de

paisagens relativamente áridas, particularmente campos de altas altitudes e afloramentos rochosos, de distribuição disjunta na América do Sul, África e algumas espécies remanescentes em Madagascar. São perenes, tolerantes à dissecação e bem adaptadas ao fogo, ao ponto de algumas vezes serem referidas como “plantas de ressurreição” (Franceschinelli *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 1991). No Brasil, as espécies pertencentes a essa família são comumente encontradas em campo rupestre de altitude, entre 1.000 a 2.000 m, em solos pouco profundos, sobre afloramentos rochosos quartzíticos, ou também em campos cerrados e campos sujos secos ou sujeitos a alagamentos temporários. As populações encontram-se adensadas ou dispersas nos locais de endemismo (Oliveira *et al.* 1991). O gênero *Vellozia* contém muitas espécies com fenologia característica de curta estação de floração, geralmente com duração de poucas semanas para toda a população e alto nível de auto-incompatibilidade (Franceschinelli *et al.* 2006).

Vellozia squamata Pohl (Figura 5) apresenta uma ampla distribuição no Domínio do Cerrado, compreendendo os estados de Tocantins, Goiás e noroeste de Minas Gerais (Mello-Silva 2013). Pode ser encontrada em localidades com solos superficiais de substratos rochosos, em solos profundos e em Latossolos muito drenados, característicos do Domínio fitogeográfico do Cerrado. Essa espécie se apresenta como um arbusto lenhoso e pode atingir até 4 m de altura, a partir da superfície do solo (Oliveira *et al.* 1991).

As populações de *V. squamata* apresentam episódios de floração sincronizada entre parte dos indivíduos, ao longo da estação reprodutiva, que se estende de março a maio/junho, com duração de 24-72 horas em cada episódio de floração. Assim como outras espécies do gênero, *V. squamata* apresenta incompatibilidade à auto-polinização, porém, pode ocorrer a fecundação com formação de frutos pequenos, maturados irregularmente, secos ou com sementes inviáveis (Oliveira *et al.* 1991). Portanto, apesar da endogamia ser fortemente desfavorecida na espécie, ela é considerado nos estudos genéticos populacionais, como uma espécie hermafrodita, com possibilidade de autofecundação. Quanto aos polinizadores, existem quatro espécies de abelhas generalistas, sendo a *Trigona spinipes* (Fabricius), popularmente conhecida como irapuá, encontrada com maior frequência nas suas flores (Oliveira *et al.* 1991). A espécie é de vida longa.

Figura 5: Aspectos de *Vellozia squamata* Pohl. Canto superior esquerdo: indivíduo adulto em período reprodutivo; canto superior direito: detalhe do caule; canto inferior esquerdo: detalhe da flor; canto inferior direito: fruto desenvolvido (Fotografias de João de Deus Medeiros e C. Tak).

3.4. Métodos

A metodologia para se chegar aos objetivos propostos abrangeu as seguintes etapas a) coletas em campo e georeferenciamento dos indivíduos de *V. squamata* do local de estudo; b) construção da biblioteca enriquecida com marcadores moleculares do tipo microssatélite (SSR) e sequenciamento dos locos para a espécie considerada; c) identificação e seleção de SSRs mais informativos que caracterizassem a população de *V.squamata*; d) genotipagem dos indivíduos amostrados; e) comparação dos dados estimados nas parcelas sob diferentes regimes de fogo.

Coletas em Campo e Localização dos Indivíduos

A coleta de indivíduos de *Vellozia squamata* Pohl foi realizada na área do Projeto Fogo, instalado na Reserva Ecológica do IBGE – RECOR, Brasília, DF, em fisionomia de campo sujo. Uma área adicional de coleta, próxima às parcelas do Projeto Fogo, mas não fazendo parte dele, foi acrescentada para servir de controle externo. De acordo com a RECOR, nessa área não há condução de nenhum tipo de experimentação com fogo, sendo considerada uma área de preservação natural e sujeita a queimadas acidentais. Desta forma, essa área foi denominada Controle Externo (CE) neste projeto.

Em cada parcela com diferentes tratamentos, folhas vivas maduras de indivíduos de *V. squamata* foram coletadas, com tesoura de poda, para posterior obtenção de DNA genômico. As coletas de folhas ocorreram em dois períodos: a primeira, em outubro de 2011, somente nas cinco parcelas do Projeto Fogo; a segunda coleta ocorreu em janeiro de 2012, nas cinco parcelas do Projeto Fogo e no controle externo, nas mesmas condições da primeira coleta. Tanto em outubro/ 2011 como em janeiro/ 2012, não foram encontrados indivíduos com estruturas reprodutoras; no mês de outubro, o clima era seco, com sol e ausência de chuvas durante os dias de coleta; no mês de janeiro, o clima local era bastante úmido com chuvas em praticamente todos os dias de coleta.

Os indivíduos vivos e mortos amostrados nas parcelas do Projeto Fogo, nas duas coletas realizadas, representaram a totalidade dos indivíduos, constituindo,

portanto, um censo. O mesmo não ocorreu para a área do Controle Externo, cuja área amostrada foi uma pequena parte do total da área preservada.

As folhas de cada indivíduo foram armazenadas individualmente em sacos de papel e identificadas. Depois, as amostras foram colocadas em sacos plásticos com zíper de vedação e sílica gel, para evitar a umidade, e em uma caixa térmica e foram transportadas até Laboratório de Melhoramento e Diversidade Genética, ESALQ-USP, onde realizou todas as análises genéticas.

Para a localização da posição geográfica de todos os indivíduos vivos e considerados mortos, utilizou-se um GPS de alta precisão (marca Garmin®). Posteriormente, cada indivíduo foi localizado sobre imagem de satélite obtida no sistema *Google Earth*®.

Densidade de *V. squamata* nas parcelas de fogo e controles

Os indivíduos de *V. squamata* tiveram sua densidade populacional determinada nas cinco parcelas e na área adjacente aos tratamentos (controle externo, CE). Desses indivíduos, foram coletadas amostras foliares viáveis para as análises genéticas.

3.5. Análises Genéticas

Extração de DNA Genômico e Digestão

As amostras foliares de *V. squamata* foram retiradas de suas embalagens e envolvidas em tule (pano sintético vazado) com elástico. Em seguida, os pacotes foram congeladas em nitrogênio líquido e depois armazenadas no congelador a -80°C para preservar o tecido foliar. Devido à dureza das folhas de *V. squamata*, as amostras foram liofilizadas e trituradas em moinho. Na forma de grânulos finos ou pó, foram armazenadas em tubos de plástico Falcon, de 15 mL, e identificadas. A partir desse material, iniciou-se o procedimento para a obtenção de marcadores genéticos do tipo microssatélite.

A extração do DNA genômico total seguiu o protocolo Doyle & Doyle (1990), com adaptações. A descrição completa do protocolo de extração, limpeza do DNA e preparação das soluções de uso encontram-se no Anexo 1. Para testar a qualidade do DNA extraído (verificar sua fragmentação), foi utilizada a enzima de restrição EcoRI, somente para teste.

Biblioteca Genômica Enriquecida de Microssatélite

A construção da biblioteca genômica é o primeiro passo para obtenção dos locos com SSR. A construção da biblioteca genômica ocorreu durante o curso – NT264_A/UNICAMP: Microssatélites para Estudos Genéticos de Eucariotos, em janeiro/fevereiro de 2011. O protocolo completo aplicado na construção da biblioteca pode ser obtido no sítio do Laboratório de Análise Genética e Molecular, CBMEG-UNICAMP <<http://www.cbmeg.unicamp.br/>>.

A técnica usada foi adaptada de Kijas *et al.* (1994), Billotte *et al.* (1999) e Zane *et al.* (2002) e descrita resumidamente a seguir (Figura 6). A partir do DNA genômico total a 250ng/μL, digere-se com a enzima *Afa* I para obtenção de fragmentos de DNA entre 200 a 1.700 bp. Em seguida, adiciona os adaptadores *Afa*21 5´ CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3´ e *Afa*25 5´ TAGTCCACGCGTAAGCAA GAGCACA 3´, para assegurar que todos os fragmentos selecionados tenham exatamente a mesma terminação. Segue a amplificação dos fragmentos de DNAs genômicos, para garantir quantidade suficiente e assegurar que os mesmos tenham os adaptadores, e a purificação e preparação para etapa de seleção de fragmentos. O produto da PCR foi purificado com “Quiaquick PCR purification kit” (QIAGEN® Cat. # 28106) e após, foi feita a seleção de fragmentos de interesse com a sonda biotinalada, Biotina – IIII (CT)8 e Biotina – IIII (GT)8, e estreptavidina. Nessa fase, a seleção dos fragmentos de DNA com motivos de SSR foi realizada, bem como a amplificação por PCR dos fragmentos selecionados, para aumentar a quantidade de fragmentos de DNA de fita dupla. Foi feita a inserção e clonagem dos fragmentos amplificados é feita via vetor de clonagem, plasmídeo, “pGEM-T® and pGEM-T Easy Vector Systems®”, e a transformação em células de *Escherichia coli* com o plasmídeo com o fragmento de interesse. Mantiveram-se os clones positivos, isto é, com colônias das bactérias em que ocorreu a transformação. Os clones foram

armazenados congelador a -80°C. Seguiu-se a minipreparação – extração dos plasmídeos das bactérias transformadas e a reação de sequenciamento (o protocolo de preparação das amostras para o sequenciamento dos fragmentos de interesse pode ser obtido no sítio do Laboratório de Análise Genética e Molecular, CBMEG-UNICAMP: <<http://www.cbmeg.unicamp.br>>).

Figura 6: Esquema simplificado do método usado para construção da biblioteca genômica enriquecida de SSR.

Desenho de Iniciadores

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Análise Genética e Molecular, CBMEG-UNICAMP, em Sequenciador Automático de DNA - ABI 3500 Genetic Analyzer de oito capilares da marca Applied Biosystems®. Os *primers* foram desenhados nas regiões adjacentes, isto é, que flanqueiam a sequência de microssatélites.

Dos 48 fragmentos de DNA, obteve-se 51 pares de *primers* desenhados utilizando-se os programas: BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999), cromatograma; Vec screen (NCBI, 2012), identificação dos vetores de origem conhecida e não pertencentes a *V. squamata*; WebSat (Martins *et al*, 2009), identificação os SSRs; Gramene SSRtool (Temnykh *et al*, 2001), identificação dos SSRs; Primer3 30.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000), desenho dos *primers*; Gene Runner 3.05 (Hastings Software, 1994), que avalia a qualidade dos *primers* desenhados; Sequencher 5.0 demo (Gene Codes Inc., 2011), identificação dos *contigs*, ou fragmentos repetidos.

Otimização e Caracterização dos Iniciadores

Na síntese dos *primers* para todas as sequencias *sense* foi adicionado cauda M13 forward (-29): 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3', iniciador universal para marcação com fluorocromo (de Arruda 2009, com adaptações). *Primers* com fluoróforos foram detectados pelo genotipador automático DNA Analyzer 4300 da LI-COR®, sistema baseado em tecnologia de detecção sensível a fluorescência no espectro do infravermelho.

A reação de otimização dos *primers* iniciou com o mix de reação, quantidade de uma reação por amostra: 2,00 µL tampão (1x); 1,60 µL MgCl (25 mM); 0,4 µL BSA (comercial); 1,00 µL dNTP (2,5mM); 0,32 µL *primer* sense (10 µM), 0,4 µL *primer* anti-sense (10 µM); 0,6 µL IRDye700 ou IRDye800 (marca LI-COR®); 1,2 µL Taq caseira; 10,48 µL água ultra-pura; e 1,00 µL DNA (10ng/µL), tendo como volume final da reação 20 µL. Ciclo de reação no termociclador: início 94°C/5min; denaturação 94°C/40s; hibridação 58°C/40s; extensão 72°C/1min; final 72°C/10min; infinito a 4°C. Repete-se 30-40 vezes o ciclo de denaturação, hibridação e extensão. O IRDye 700 e IRDye 800 phosphoramidites são oligos que permitem a leitura no espectro de absorbância a 700nm e 800nm, respectivamente. Foram acrescentados no mix de PCR, no qual se anexa a cauda M13 durante a reação de PCR e, permitindo posterior visualização no genotipador DNA Analyzer. Optou-se pela escolha de apenas um IRDye para reação cada de PCR.

3.6. Análise de Dados

A partir dos 257 indivíduos genotipados distribuídos nos cinco tratamentos de fogo, mais o controle externo (CE) foram estimados os parâmetros populacionais de diversidade e estruturação genética de *Vellozia squamta* Pohl, abaixo descritos.

Diversidade Genética

Para o estudo da diversidade genética foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas da população por meio do programa FSTAT, versão 2.9.3.2 (Goudet 1995 e 2002) e do programa GDA (Lewis & Zaykin 2001), no qual se obteve as heterozigosidade esperada e observada, média de alelos por loco, média das frequências alélicas dos alelos privados, índice de fixação (f). A conversão dos dados genotípicos para leitura no programa FSTAT, GDA e STRUCTURE foi realizada por meio do programa CREATE (2008).

Estruturação Genética Populacional

Para o estudo da estrutura genética populacional, foram utilizadas as estatísticas F_s de Wright (1951) e Nei (1978) utilizando-se o programa FSTAT, versão 2.9.3.2 e no programa GDA.

Foi utilizado o programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) para definir o número de grupos (k) mais provável que acomoda os indivíduos coletados. Os parâmetros usados no programa foram “length of burnin period” = 200.000, MCMC = 500.000, k de 1 a 15. Dez simulações independentes foram feitas para cada valor de k . Em cada simulação, foram feitas 500.000 reamostragens, com um descarte inicial (burn-in) de 200.000. Através do programa Harvester STRUCTURE (Earl 2012) determinou-se o número k mais provável em relação aos propostos no STRUCTURE, a partir dos valores de todos os ΔK (conforme Evanno *et al.* 2005). Uma vez determinado o número k mais provável, usou-se o programa Clumpp (Jakobsson & Rosenberg 2007), para fazer a média em relação às dez iterações dos grupos escolhidos, e o programa Distruct (Rosenberg 2007) para gerar a representação gráfica do resultado do Clumpp.

A estrutura genética dentro e entre diferentes tratamentos também foi avaliada com a AMOVA usando programa *Arlequin* v.3.5 (Excoffier & Lischer 2010). A significância dos índices de fixação foi testada com 10.000 permutações.

Foram usadas as estatísticas- F de Wright para avaliar a endogamia intrapopulacional, por meio do programa GenePop, versão 4.1.4 (Rousset 2008) para os dez locos selecionados usados na genotipagem da população. A conversão dos dados genotípicos para leitura no programa GenePop foi realizada por meio do programa CREATE (Coombs *et al.* 2008). Foram calculados os índices F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} .

4. RESULTADOS

4.1. Material Vegetal e Extração DNA Genômico

Do total amostral de 719 indivíduos georreferenciados (Figura 7), obteve-se a densidade relativa por tratamento, exceto para CE. As densidades nas parcelas submetidas a queimadas prescritas foram semelhantes – de 27,50 a 29,50 indivíduos por hectare, na parcela controle, foi um pouco superior (Tabela 3).

Realizou-se a extração do DNA genômico de 630 indivíduos com amostras foliares, e em seguida quantificou dos DNAs genômicos desses indivíduos em gel de agarose (Figura 8). Para alguns indivíduos testou a digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Figura 9).

Tabela 3: Número total de indivíduos de *Vellozia squamata* Pohl georreferenciados (**N° total**) e densidade (**N°/ha**), nos tratamentos do Projeto Fogo mais Controle Externo. A área total por tratamento é de 4 ha e a área estimada do Controle Externo é desconhecida.

Censo Populacional de <i>Vellozia squamata</i>						
Indivíduos	Bienal Precoce	Bienal Modal	Bienal Tardia	Quadrienal Modal	Controle	Controle Externo
Vivos com amostra foliar	111	105	103	106	104	106
Vivos sem amostra foliar	-	-	-	-	11	3
Mortos	6	5	8	12	21	18
N° total	117	110	111	118	136	127
Densidade	29,25	27,50	27,75	29,50	34,00	-

Figura 7: Distribuição espacial de todos indivíduos amostrados nos cinco tratamentos do Projeto Fogo – campo sujo, RECOR-IBGE, Brasília-DF e, em uma área preservada próxima aos tratamentos, Controle Externo (CE). Os pontos coloridos são os indivíduos com amostras foliares e em branco sem amostras de material genético.

Figura 8: Quantificação do DNA genômico total de *Vellozia squamata* Pohl. em parte dos indivíduos do tratamento “controle”. (Gel de agarose a 1%. Volume final da diluição em TE 100 μ L. Extração do DNA genômico total e quantificação.)

Figura 9: Quantificação da extração de DNA genômico total e digestão com a enzima *EcoR* I. De 1 a 3 apresenta o resultado quantificação da extração; L = 250 λ ; de 4 a 6 digestão; e Lad = “ladder” 50 pb.

4.2. Desenho de Iniciadores e Otimização

Dos 48 clones gerados pela biblioteca enriquecida com SSRs sequenciados foram obtidos 51 *primers* (Anexo 3). A figura 10 representa a leitura da sequência Vsq11. Todas as sequências genômicas identificadas, referentes a 48 fragmentos de DNA sequenciados estão depositados no GeneBank com previsão para publicação em dezembro de 2013. Na figura 11 apresenta o gel de acrilamida a 5% dos testes de primers de Vsq25 a Vsq49, os pontos brancos são amplificação do produto da reação de PCR que corresponde aos fragmentos de DNA amplificados delimitado pelos seus respectivos primers. Nesse caso, é apresentado pelo número de pares de base do fragmento amplificado. Nas extremidades do gel virtual, visualizam-se os pontos brancos, ou seja, *ladder* de 50, 75, 94, 100, 105, 120, 145, 175, 200, 204, 240, 300, 325 e 350 pares de base respectivamente.

Figura 10: Resultado do sequenciamento da região referente ao **Vsq11**, apresentado pelo cromatograma BioEdit da sequência com número de acesso ao GenBank KC990052.

Figura 11: Amplificação primers **Vsq25** a **Vsq40** em gel de acrilamida a 5%, desenvolvidos para *V. squamata* a partir de 12 indivíduos, utilizando-se sequenciador DNA Sequencer 4300S Analyzer - LICOR.

4.3. Genotipagem da População Amostral de *Vellozia squamata* Pohl

Do sorteio de 630 indivíduos com amostras foliares (item 4.1), 372 indivíduos foram genotipados, sendo 62 indivíduos por tratamento de queima, além do CE. Para o sorteio usou o código para programa R de sorteio amostral (Anexo 2). Apenas 257 indivíduos puderam ser usados nas análises moleculares, devido a falhas durante a amplificação dos locos. Assim, os números de indivíduos genotipados por tratamento de fogo e no CE foram: BP=33; BM=53; BT=33; QM=43; C=61; e CE=29 (Figura 13). A Tabela 4 apresenta os dez locos com seus respectivos primers usados na caracterização da população de *V. squamata*. A e a figura 14 exemplifica, através do *primer* Vsq11, o perfil de gel de acrilamida a 5% (em genotipador Licor) e com amplificação obtidos na genotipagem de 61 indivíduos de *V. squamata*.

Figura 12: Distribuição espacial de todos os indivíduos genotipados e analisados (pontos brancos).

Tabela 4: Sequências *primers* dos dez locos desenvolvidos a partir da biblioteca genômica enriquecida de SSR de um único indivíduo de *Vellozia squamata* Pohl. A temperatura de anelamento para todos os locos foi de 58°C.

Locos	Sequências sense (5'-3')	Sequências antisense (5'-3')	Motivo	Pb	Acesso GeneBank
Vsq11	ATCATCCACACGCTCCTCTT	CATCTATCCTCCCCAAACCA	(AC) ₁₁ ATA(CA) ₁₀ (CA) ₉ (CAA) ₉	215-253	KC990052
Vsq26	GTTGATGGTATTCGGGTTTCG	CTCTTCCCCCTTCCTTTCC	(AC) ₁₀	172-214	KC990066
Vsq33	TGGTATGCGTCTTTTATGTGG	TTACGGACCCATCAATAAGC	(AG) ₆ ATG(CA) ₁₃	203-242	KC990073
Vsq34	AATGATCCGACCTTATTCACC	TCAACCCACGATCTTTTGG	(CT) ₁₅	151-181	KC990074
Vsq37	TGGTTTGTGGTTTGTGGTTTGG	GGAATCGCAAATTGAGTGG	(TG) ₈ T(TG) ₂	299-307	KC990077
Vsq38	CGGGAAGTCCTAAGCAACC	TTCAGAGAGAGAGCGTTTGG	(GA) ₁₁ ...(CT) ₅	205-221	KC990078
Vsq39	TCCTATGTGGGGATTATTTGC	GGACTAGCCTTCAAGTATGACG	(AC) ₇	265-281	KC990079
Vsq45	ACCTCGTCAACAGTGAGACC	CTTCTTCAACCGCAACTCC	(GT) ₉ (GA) ₁₆	222-254	KC990084
Vsq47	ATCATGCGTTCAAAAGTTGG	AGCCTGGAACAGATGACC	(AC) ₃ AT(AC) ₈	213-239	KC990086
Vsq48	AGCAATTTAGTGATGGAGTTGG	CGATGAAACAGGAACAATAAGG	(CA) ₁₄	224-248	KC990087

Figura 13: Gel de acrilamida a 5% em sequenciador DNA Sequencer 4300S Analyzer - LI-COR contendo a amplificação de 61 indivíduos com o primer Vsq11.

4.4. Estimativas dos Parâmetros Populacionais

A partir dos 257 indivíduos genotipados (Anexo 4) distribuídos nos cinco tratamentos e controle externo, obteve-se os resultados estatísticos de diversidade e estruturação genética de *Vellozia squamta* Pohl na área experimental do Projeto Fogo, sob diferentes frequências de fogo.

Diversidade Genética:

Verifica-se que os parâmetros de diversidade genética estão relacionados aos tratamentos de queima e ao controle externo (Tabela 5). As médias estimadas do tratamento C para riqueza alélica ($\bar{R}_A$) e heterozigosidade esperada ($\bar{H}_e$) foram superiores aos demais tratamentos. Entre os tratamentos a QM teve a menor média

estimada para os parâmetros de $\bar{R}_A$ e $\bar{H}_e$. Os valores de $\bar{H}_e$ e $\bar{H}_o$, porém, foram semelhantes entre os diferentes tratamentos com queima prescrita.

A endogamia intrapopulacional média foi $\bar{f} = 0,39$, ou seja, ocorre mais autofecundação e/ou cruzamentos entre os indivíduos presente dentro de cada tratamento e área adjacente (Tabela 5). Isso pode ser indicativo de que a espécie tem de cruzamento misto. Por fim, o tratamento BP mostrou a maior frequência de heterozigos observados ($\bar{H}_o = 0,61$), com o índice de fixação ($\bar{f} = 0,21$).

Em relação à caracterização da população por locos (Tabela 6), verifica-se que os locos Vsq11 e Vsq37 apresentaram valores diferentes para quase todos os parâmetros analisados. Com base nessas estimativas populacionais calculadas loco a loco, pode-se concluir que o loco Vsq37 foi o que apresentou a menor estimativa para todos os parâmetros, exceto para endogamia. Os locos Vsq11 e Vsq45 tiveram um maior número de alelos efetivos, ou seja, são bem informativos; o mesmo vale para riqueza alélica esses mesmos locos que apresentaram os maiores valores.

Tabela 5: População de *V. squamata* subdividida por tratamento relativo aos índices de número total de indivíduos com amostra foliares (N_{total}); número de indivíduos genotipados (N); média de alelos por loco ($\bar{A}$); média da riqueza alélica ($\bar{R}_A$); alelos privados (Apr); média total da heterozigotidade esperada ($\bar{H}_e$); média total da heterozigotidade observada ($\bar{H}_o$); Índice de fixação ($\bar{f}$) coeficiente de endogamia intrapopulacional. Média aritmética (**Média**) e desvio padrão (**S**).

Tratamento	N_{total}	N	$\bar{A}$	$\bar{R}_A$	Apr	$\bar{H}_e$	$\bar{H}_o$	$\bar{f}$
Bienal Precoce	105	38	9,50	6,02	7	0,76	0,61	0,21
Bienal Modal	105	53	10,60	5,92	10	0,80	0,49	0,39
Bienal Tardia	104	33	11,50	5,64	7	0,79	0,48	0,40
Quadrienal Modal	106	43	10,40	5,60	8	0,74	0,46	0,38
Controle	104	61	12,60	6,36	6	0,85	0,40	0,52
Controle Externo	106	29	8,00	5,42	3	0,78	0,45	0,43
Média	105	42,83	10,43	5,83	6,83	0,79	0,48	0,39
S	0,89	12,21	1,59	0,34	2,32	0,04	0,07	0,10

Tabela 6: Dados da população total de *V. squamata* por loco polimórfico: índices da média de alelos por loco ($\bar{A}$) e desvio padrão ($S\bar{A}$); média da riqueza alélica ($\bar{R}_A$) e desvio padrão

($\overline{SR_A}$); média de heterozigosidade esperada ($\overline{H_e}$) e desvio padrão ($\overline{SH_e}$); heterozigosidade observada ($\overline{H_o}$) e desvio padrão ($\overline{SH_o}$); e média do índice de fixação ($\overline{f}$).

Loco	$\overline{A}$	$\overline{SA}$	$\overline{R_A}$	$\overline{SR_A}$	$\overline{H_e}$	$\overline{SH_e}$	$\overline{H_o}$	$\overline{SH_o}$	$\overline{f}$	$\overline{Sf}$
Vsq11	17,33	3,27	8,02	0,46	0,91	0,02	0,69	0,10	0,24	0,10
Vsq26	10,67	5,20	5,41	1,45	0,76	0,11	0,54	0,13	0,30	0,10
Vsq33	11,67	3,08	6,35	1,32	0,81	0,11	0,64	0,21	0,23	0,19
Vsq34	12,00	1,41	6,07	0,54	0,80	0,05	0,44	0,10	0,46	0,10
Vsq37	4,33	1,75	2,90	1,08	0,47	0,30	0,02	0,02	0,77	0,39
Vsq38	8,33	1,63	5,74	0,66	0,83	0,05	0,60	0,10	0,28	0,10
Vsq39	8,00	1,26	5,56	0,54	0,82	0,03	0,43	0,25	0,49	0,29
Vsq45	15,83	2,23	8,17	0,42	0,92	0,01	0,61	0,23	0,35	0,25
Vsq47	7,50	1,38	4,35	0,78	0,72	0,08	0,35	0,30	0,53	0,37
Vsq48	8,67	3,88	5,69	1,52	0,82	0,08	0,50	0,23	0,40	0,27

Estrutura Populacional:

A estrutura populacional determinada pela abordagem estatística bayesiana (implementado pelo programa Structure) mostrou que o grupo k=3 foi o mais provável quanto à subdivisão da população de *V. squamata* (Figuras 14 e 15). Contudo, também se pode considerar que o grupo k=5 como igualmente verossímil, pois a estruturação apresentada por esse grupo se manteve nos valores subsequentes de k. Essa análise mostra que o tratamento 5 apresentou a maior variação (diversidade), corroborando os resultados da estatística descritiva (Tabela 5). O tratamento 2 possui muitos indivíduos compartilhados com o tratamento 1 e com o tratamento 6. Isto corrobora os valores encontrados de F_{ST} , indicando fluxo entre as parcelas (Tabela 7).

Figura 14: Indicação do k mais verossímil ($k=3$), por meio do programa Harvester Structure, conforme a metodologia do Delta K implementado por Evanno *et al.* (2005) (esquerda) e a metodologia de Pritchard *et al.* (2000) (direita).

Figura 15: Teste de atribuição bayesiano com $k=3$ (gráfico superior) e $k=5$ (gráfico inferior), para a população de *V. squamata* (Projeto Fogo, campo sujo, RECOR-IBGE, Brasília-DF).

O valor de $\bar{F}_{ST} = 0,084$, a existência de uma variação entre tratamentos, e este valor é considerado intermediário (Wright 1951). Essa variação pode estar relacionada com a deriva (subdivisão de populações), assim como com a variabilidade devida a diferentes frequências de fogo entre os tratamentos.

A comparação par a par dos valores estimados de F_{ST} para os diferentes tratamentos de queima (Tabela 8), constatou-se que ocorre moderada diferenciação genética entre os tratamentos e CE, sendo que os pares de tratamentos com menor F_{ST} foram BM e BC; C e CE.

Tabela 7: Estruturação em relação à endogamia e subdivisão da população total, Frequência alélica baseado na correlação $\bar{F}_{ST}$ e $\bar{F}_{IT}$. Média aritmética e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

	Vsq11	Vsq26	Vsq33	Vsq34	Vsq37	Vsq38	Vsq39	Vsq45	Vsq47	Vsq48	Médio	IC 95%
$\bar{F}_{IS}$	0,25	0,32	0,22	0,46	0,95	0,28	0,51	0,39	0,61	0,42	0,413	0,324 0,526
$\bar{F}_{ST}$	0,03	0,09	0,09	0,036	0,39	0,04	0,02	0,01	0,12	0,04	0,084	0,037 0,156
$\bar{F}_{IT}$	0,27	0,38	0,29	0,48	0,97	0,30	0,52	0,39	0,66	0,44	0,462	0,360 0,595

Tabela 8: Comparação par a par dos valores de F_{ST} entre os diferentes tratamentos de queima e controle externo (BP= queima bienal precoce; BM= queima bienal modal; BT= queima bienal tardia, QM= queima quadrienal modal; C= controle; CE= controle externo)

	BP	BM	BT	QM	C
BM	0,06				
BT	0,13	0,08			
QM	0,08	0,10	0,10		
C	0,07	0,05	0,07	0,07	
CE	0,12	0,06	0,13	0,14	0,04

A partir das estatísticas de diversidade de Nei (Tabela 9) se observa que o loco Vsq37 apresenta menor divergência na população para todos os parâmetros e entre os tratamentos e o controle externo, e maior divergência entre os indivíduos para todos os parâmetros. Para a população com um todo pode se verificar que a média diversidade gênica total ($H'_T = 0,87$), a diversidade gênica dentro ($H_S = 0,79$), a diversidade entre tratamentos ($D'_{ST} = 0,08$). A diversidade devido a subdivisão da

população ($G'_{ST} = 0,09$) indicam uma divergência entre tratamentos e é análoga com a estimativa F_{ST} de Wright.

Considerando-se a distância genética de Nei (Tabela 10), verifica-se que há maior divergência entre os tratamentos BP e BT dentre somente os tratamentos do Projeto Fogo, assim como entre BT e CE. Menor divergência ocorre entre tratamentos de queimas BP e BM.

Tabela 9: Heterozigosidade observada ponderada por população (H_o), diversidade dentro da população (H_s e H'_T), diversidade total da população (H_T), diversidade entre os tratamentos (D_{ST} e D'_{ST}), diversidade entre os tratamentos (G_{ST} e G'_{ST}), diversidade genética intrapopulacional (G_{IS}), seguindo as estatísticas de Nei. Média aritmética (**Média**) e desvio padrão (**S**).

Loco	H_o	H_s	H_T	H'_T	D_{ST}	D'_{ST}	G_{ST}	G'_{ST}	G_{IS}
Vsq11	0,69	0,92	0,94	0,94	0,02	0,03	0,02	0,03	0,24
Vsq26	0,54	0,77	0,83	0,84	0,06	0,07	0,07	0,09	0,30
Vsq33	0,64	0,81	0,89	0,90	0,08	0,09	0,08	0,10	0,21
Vsq34	0,43	0,81	0,83	0,83	0,02	0,03	0,03	0,03	0,46
Vsq37	0,02	0,48	0,72	0,76	0,23	0,28	0,33	0,37	0,95
Vsq38	0,60	0,83	0,87	0,87	0,04	0,04	0,04	0,05	0,27
Vsq39	0,43	0,84	0,85	0,85	0,02	0,02	0,02	0,02	0,49
Vsq45	0,61	0,93	0,94	0,94	0,01	0,02	0,01	0,02	0,35
Vsq47	0,35	0,72	0,82	0,84	0,10	0,12	0,12	0,14	0,52
Vsq48	0,50	0,83	0,89	0,90	0,06	0,07	0,07	0,08	0,40
Média	0,48	0,79	0,86	0,87	0,06	0,08	0,07	0,09	0,39
S	0,19	0,13	0,07	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10	0,21

Tabela 10: Matriz de distância genética de Nei construída a partir dos 10 locos polimórficos usados na genotipagem da população, calculadas com o programa GDA (BP= queima bienal precoce; BM= queima bienal modal; BT= queima bienal tardia, QM= queima quadrienal modal; C= controle; CE= controle externo).

	BP	BM	BT	QM	C
BM	0,27				
BT	0,80	0,45			
QM	0,34	0,52	0,52		
C	0,39	0,35	0,45	0,37	
CE	0,66	0,35	0,88	0,77	0,28

O teste Exato de Fisher, o loco está em equilíbrio neutro, ou Equilíbrio de Hardy Weinberg quando o valor de $\alpha' > 0,005$. Os locos Vsq26, Vsq33, Vsq38, Vsq39 e Vsqu48 em pelo menos um dos tratamentos mais controle externo está em EHW (Tabela 11). Para todos os locos das populações, o χ^2 apresentou valor infinito e probabilidade altamente significativa. Isto corrobora o valor encontrado com o F_{IS} , indicando que os indivíduos desses tratamentos não estão em panmixia, ou não possuem alogamia perfeita, isto é, tendem a apresentar cruzamento misto, ou excesso de cruzamento entre indivíduos aparentados.

Tabela 11: Valores resultantes do Teste Exato de Fisher, para os locos e populações, obtidos por meio do programa GenePop. Valores destacados em vermelho significam equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tratamento	BP	BM	BT	QM	C	CE
Vsq11	0,0000	0,0000	0,0036	0,0000	0,0000	0,0001
Vsq26	0,0024	0,0043	0,0000	0,0000	0,0000	0,2091
Vsq33	0,0004	0,0580	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
Vsq34	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003
Vsq37	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Vsq38	0,0050	0,0238	0,0013	0,0006	0,0000	0,0085
Vsq39	0,0000	0,0080	0,0000	0,0000	0,0000	0,0251
Vsq45	0,0001	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0016
Vsq47	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003
Vsq48	0,0000	0,0000	0,0004	0,5874	0,0000	0,1342

A análise da AMOVA considerou os tratamentos na forma de grupos relacionados à época (precoce, modal e tardia); frequência (bienal, quadrienal e ausente); queimas prescritas (tratamentos) e queima natural (Controle Externo). As comparações observadas na Tabela 12 foram para averiguar se existe diferença entre os grupos sob regime de fogo em relação à: época tratamento– grupo precoce (BP), grupo modal (BM e QM) ou (BM ,QM e CE), quando se considerou também o controle externo, e grupo tardio (BT); frequência de queima: quaimadas bienais (BP, BM me BT), quadrienal (QM), frequência “natural” (CE) e ausência de queima (Controle); e queimas prescritas (BM, BP, BT, QM) e natural (CE).

Os resultados obtidos indicaram que a maior parte da fonte de variação está ‘dentro dos tratamentos’, com mais de 89% para todos os grupos comparativos. A

significância para ‘dentro de grupos’ e ‘dentro de tratamentos’ foi de $p = 0,000$ e a porcentagem total da variação (%var) com $p < 0,05$.

Tabela 12: Resultados obtidos da AMOVA relacionados à época tratamento, tratamentos em diferentes épocas: grupo precoce (BP), grupo modal (BM e QM) e grupo tardio (BT); época com o Controle Externo: grupo precoce (BP), grupo modal (BM, QM e CE) e grupo tardia (BT); frequência de queima: grupo dos tratamentos com queimas prescritos (BP, BM, BT e QM) mais queima natural, e grupo ausente (Controle); e queimas prescrita e natural, grupo de tratamentos prescritos (bienais mais quadrienal) e grupo CE. Graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ) e porcentagem total da variação (%var) com $p < 0,05$. A significância ($p=0,0000$) para ‘Dentro de grupos’ e ‘Dentro dos tratamentos’.

Grupos comparativos	Fontes de variação									
	Entre grupos				Dentro grupos			Dentro dos tratamentos		
	GL	SQ	%var	p	GL	SQ	%var	GL	SQ	%var
época tratamentos	2	9,707	10,27	0,176	1	0,696	0,79	330	124,734	88,94
Época com CE	2	6,142	- 3,23	0,104	2	9,600	13,60	387	139,769	89,63
Frequência	1	1,772	- 3,77	0,217	3	10,404	8,93	541	178,070	94,83
queimas prescrita e natural	1	5,338	6,28	0,205	3	10,404	8,84	387	139,769	84,89

5. DISCUSSÃO

O resultado da estimativa da diversidade genética, $\bar{H}_e$, encontrada na população foi alto (Tabela 5). *Vellozia squamata* apresentou maiores valores de $\bar{H}_e$ em comparação com as demais espécies do gênero, como *Vellozia gigantea* (analisada com marcadores ISSR, Lousada *et al.* 2011) e SSR (Martins 2012), *Vellozia compacta* analisada com ISSR (Lousada *et al.* 2013), *Vellozia epidendroides* e *Vellozia leptopetalas*, analisadas com aloenzimas (Franceschinelli *et al.* 2006). Altos valores também foram encontrados nas populações endêmicas do Cerrado de *Caryocar brasiliense*, em cerrado, com uso do marcador SSR (Collevati *et al.* 2001). *Grevillea macleayana*, espécie dependente de fogo, analisada com marcador SSR (England *et al.* 2002) e *Persoonia mollis*, espécie sensível ao fogo, analisada com aloenzima (Krauss 1997), apresentaram valores menores de diversidade genética em suas populações, quando comparadas com *V. squamata*. O fato das estimativas de $\bar{H}_e$ obtidas neste estudo terem apresentado resultados

diferentes entre alguns tratamentos pode apoiar a proposição defendida de Verdú (2000), Pausas & Keeley (2009) e Keeley *et al.* (2011), em que as espécies savânicas são adaptadas a um particular regime de fogo. Considerando que a *V.squamata* apresenta elevada expectativa de vida (Oliveira *et al.* 1991, Alves 1994), seria oportuno averiguar se a mesma diversidade genética que ocorre na biomassa aérea da espécie também se encontra no banco de sementes. Em espécies como *Hypericum cumulicola* (Dolan *et al.* 2008), estudada com o uso de marcadores aloenzimáticos, e *Banksia hookeriana* (Barret *et al.* 2005), onde se utilizou AFLP, são de vida longa e endêmicas de ambientes com fogo recorrente e, nelas, a diversidade genética é preservada em seus bancos de sementes. A estimativa do índice de endogamia ($\bar{f}$) média da população de *V.squamata* foi semelhante à encontrada para *V. epidendroides* e *V. leptopetalas* (Franceschinelli *et al.* 2006) e maior em relação *C. brasiliense* (Collevati *et al.* 2001). Ao comparar os tratamentos do presente estudo, destacam-se os valores do Controle ($\bar{f} = 0,52$) e Bienal Precocce ($\bar{f} = 0,21$). Desse modo, com base na diversidade genética, pode-se indicar BP como o tratamento mais adequado para a espécie, pois foi o que melhor preservou os heterozigose. A maior endogamia encontrada nos demais tratamentos pode levar à redução da diversidade genética ao longo das gerações (Lande 1988, Young *et al.* 1996, Frankham 1995, Frankhan 2005). Tal fato pode ainda não ter sido observado devido ao ciclo de vida da espécie.

Oliveira *et al.* (1991) analisou frutos de *V. squamata* e verificou que na espécie ocorre autopolinização com geração de embriões que abortam em um determinado momento antes da maturação do fruto. A partir dos números de frutos observados, calcularam o índice de autoincompatibilidade, ou ISI, que diz se uma planta é autoincompatível na recepção do próprio pólen (Bateman 1952, Seavey & Bawa 1986). Os resultados mostraram que a autoincompatibilidade somente é observada nos frutos maduros. Portanto, concluiu-se que existe autofecundação com produção de frutos inviáveis. Os resultados obtidos com as estatísticas-*F* (Tabela 7) também mostram que a espécie é endogâmica e de reprodução cruzada, isto é cruzamento misto. Ao associar tais desvios aos tratamentos, supõe-se que o regime de fogo influencie na reprodução e/ou fecundação. Há três hipóteses sobre a ocorrência do desvio da panmixia: 1) devido a um retardo na floração, pois apesar de *V. squamata* ser favorecida com as queimadas, talvez necessite de um intervalo

de tempo de recuperação pós queima;2) o fogo afetaria a viabilidade das sementes durante ou após o período de queima E. 3) o favorecimento da autofecundação, que também pode levar à produção de sementes inviáveis. Para testar as três hipóteses são necessários dados complementares sobre a reprodução da espécie, além de sua história de vida.

A análise bayesiana da estruturação genética (Figura 15) apresenta o Δk dos dois agrupamentos, $k=3$ e $k=5$, em que a população poderia ser subdivida em três e cinco grupos, respectivamente. A partir desses resultados, nega-se a hipótese da estruturação populacional não se alterar sob diferentes regimes de fogo. Considerando os grupos formados quando $k=3$ e $k=5$, observa-se que a subdivisão da população não segue exatamente as divisões dos tratamentos. Tal fato pode estar relacionado com a proximidade das parcelas que permite a migração dos propágulos entre elas.

Lousada *et al.* (2013) mostram que a estrutura das dez populações de *V. compacta* está dividida em seis grupos distintos e praticamente não há migração entre as populações. Os autores mostram que a geografia da Cadeia do Espinhaço (MG), os afloramentos rochosos e as características edáficas são as principais causas do isolamento, e uma das consequências são endemismo e a possível formação de espécies crípticas. Lousada *et al.* (2011) encontraram para *V. gigantea*, no Parque Nacional da Serra do Cipó (cadeia do Espinhaço, MG), nove populações estruturadas em dois ou três grupos. Apesar da geografia do Parque em parte justificar tal agrupamento, observa-se que, por si só, não é o suficiente para gerar barreira de migração, como observada em *V. compacta*. Considerando a estruturação das duas espécies de *Vellozia* em comparação com *V. squamata* pode-se supor que as diferentes frequências de fogo estruturaram a população, pois as condições edáficas e climáticas são semelhantes para todos os tratamentos. Em estudos futuros será necessário comparar estas populações que estudamos com outras populações de *V. squamata* mais distantes para averiguar se a estruturação genética se mantém semelhante ou altere devido à experimentação com fogo.

A média estimada da endogamia devido à subdivisão encontrada entre os tratamentos é $\bar{F}_{ST} = 0,084$, e mostra moderada diferenciação entre os tratamentos e o controle externo (conforme descrito no item 1.5). Comparando com outras

espécies satânicas, também foram encontrados valores moderados para *V. epidendroides* e *P. reticulata* e baixo valor de $\bar{F}_{ST}$ para *V. leptopetala*. Maiores valores de $\bar{F}_{ST}$ foram encontrados para *P. mollis*, *V. gigantea*, *C. brasiliensis*. Por fim, registrou-se diversidade muito alta para *V. compacta* e *H. cumulicola*.

Os resultados da AMOVA (Tabela 12) mostram que a maior parte da variação genética (superior a 89%), está ‘dentro dos tratamentos’ para todos os grupos comparativos. As populações de *V. gigantea* e *P. reticulata* (Lacerda *et al.* 2001); e o banco de sementes das plantas maternas de *B. hookerian* apresentaram resultados semelhantes a *V. squamata*, ou seja a maior parte da variação está entre os indivíduos. *V. compacta* apresentou dois resultados diferentes: considerando-se as populações, a maior parte da diversidade está ‘entre populações’; quando as populações são organizadas em grupos geográficos e edáficos, a maior parte da diversidade ficou ‘entre as populações dentro do grupo’ (Lousada *et al.* 2013) e ‘dentro das populações’, enquanto que ao organizar as populações em grupos edáficos do norte e sul da Cadeia do Espinhaço, a diversidade ficou ‘dentro das populações’. Ao comparar tais resultados, pode-se supor que a distância geográfica influencie mais na diversidade genética do que o regime de fogo para espécies satânicas. Para se verificar essa hipótese, poderiam ser feitos estudos considerando os regimes de fogo das populações distribuídas ao longo de um gradiente geográfico.

Em análises futuras será necessário verificar como o fogo afeta os indivíduos que estão mais afastados dos limites entre os tratamentos, se existem diferenças na diversidade entre o banco de sementes e indivíduos reprodutores, além do fluxo gênico direto e tamanho efetivo populacional. Desse modo, obter-se-á maiores esclarecimentos sobre como os regimes de fogo afetam a diversidade genética da população e sua distribuição no espaço.

6. CONCLUSÕES

Os locos marcadores desenvolvidos para *Vellozia squamata* Pohl foram eficientes em mostrar os polimorfismos da espécie.

A partir dos resultados gerados da diversidade genética, verificou-se alta diversidade genética na espécie *Vellozia squamata* Pohl, e a estruturação populacional mostra que existe uma tendência no cruzamento preferencial devido à distribuição espacial da população.

A alta endogamia intrapopulacional sugere que existe cruzamento entre indivíduos aparentados, ou que a espécie apresenta cruzamento misto. Para corroborar tal argumento, são necessários outros estudos a fim de verificar a taxa de cruzamento na espécie.

No único tratamento, bienal precoce, apresentou a maior frequência de heterozigotos, o que pode ser devido ao regime de fogo ou à chegada de propágulos dos demais tratamentos. Porém, ao considerar a estrutura genética da população de *Vellozia squamata*, essa estruturação pode estar mais relacionada à proximidade física entre os tratamentos o que permite o fluxo gênico, que nesse caso, pode diminuir os efeitos da estruturação populacional se relacionados aos diferentes regimes de fogo.

7. Referências Bibliográficas

- Barrett, L. G., He, T., Lamont, B. B., & Krauss, S. L. (2005). Temporal patterns of genetic variation across a 9-year-old aerial seed bank of the shrub *Banksia hookeriana* (Proteaceae). *Molecular Ecology*, 14(13), 4169-4179.
- Beaumont, M. A., & Rannala, B. (2004). The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics*, 5(4), 251-261.
- Beerling, D. J., & Osborne, C. P. (2006). The origin of the savanna biome. *Global Change Biology*, 12(11), 2023-2031.
- Bell, D. T. (2001). Ecological response syndromes in the flora of southwestern Western Australia: fire resprouters versus reseeders. *The Botanical Review*, 67(4), 417-440.
- Billotte, N., Lagoda, P. J. L., Risterucci, A. M., & Baurens, F. C. (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54(4), 277-288.
- Bond, W. J., & Keeley, J. E. (2005). Fire as a global 'herbivore': the ecology and evolution of flammable ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(7), 387-394.

- Bond, W. J., Woodward, F. I., & Midgley, G. F. (2005a). The global distribution of ecosystems in a world without fire. *New Phytologist*, 165(2), 525-538.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Bradshaw, S. D., Dixon, K. W., Hopper, S. D., Lambers, H., & Turner, S. R. (2011a). Little evidence for fire-adapted plant traits in Mediterranean climate regions. *Trends in plant science*, 16(2), 69-76.
- Bradshaw, S. D., Dixon, K. W., Hopper, S. D., Lambers, H., & Turner, S. R. (2011b). Response to Keeley et al.: Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in plant science*, 16(8), 405.
- Collevatti, R. G., Grattapaglia, D., & Hay, J. D. (2001). Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10(2), 349-356.
- Condit, R., & Hubbell, S. P. (1991). Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34(1), 66-71.
- Conner, J. K., & Hartl, D. L. (2004). *A primer of ecological genetics*. Sinauer Associates Incorporated.
- Coombs, J. A., Letcher, B. H. & Nislow, K. H. (2008). CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*. 8(3). 578-580.
<<https://bcrc.bio.umass.edu/pedigreesoftware/node/2>>
- Cooke, R. (1998). Human Settlement of Central America and Northernmost South America (14,000–8000BP). *Quaternary International*, 49, 177-190.
- Coutinho, L. M. (1978). O conceito de cerrado. *Revista brasileira de Botânica*, 1(1), 17-23.
- Coutinho, L. M. (1981). Aspectos ecológicos do fogo no Cerrado-Nota sobre a ocorrência e datação de carvões encontrados no interior de solo sob Cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 4, 115-117.
- Coutinho, L. M. (1982). Ecological effects of fire in Brazilian cerrado. In: *Ecology of tropical savannas* (pp. 273-291). Springer Berlin Heidelberg.
- Coutinho, L. M. (1990). Fire in the ecology of the Brazilian cerrado. In: *Fire in the tropical biota* (pp. 82-105). Springer Berlin Heidelberg.
- Coutinho, L. M. (2006). O conceito de bioma. *Acta Botanica Brasilica*, 20(1), 13-23.
- de Arruda, M. P., Gonçalves, E. C., Schneider, M. P. C., da Silva, A. L. D. C., & Morielle-Versute, E. (2009). An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Molecular biology reports*, 37(4), 2031-2036.
- Doyle JJ & Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12, 13-15
- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.
- Edwards, E. J., Osborne, C. P., Strömberg, C. A., & Smith, S. A. (2010). The origins of C4 grasslands: integrating evolutionary and ecosystem science. *Science*, 328(5978), 587-591.
- Eiten, George. Delimitation of the cerrado concept. *Vegetatio*, v. 36, n. 3, p. 169-178, 1978.
- Eiten, G. (1982). Brazilian “savannas”. In *Ecology of tropical savannas* (pp. 25-47). Springer Berlin Heidelberg.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), 435-445.

- Embrapa Cerrados. São Luiz: Folha SA-23-Z-A: cobertura vegetal dos biomas brasileiros. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2006. 1 mapa, color., 118 cm x 84 cm. Escala 1:250.000.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131(2). 479-491.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 10(3). 564-567. <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>>
- Franceschinelli, E. V., Jacobi, C. M., Drummond, M. G., & Resende, M. F. S. (2006). The genetic diversity of two Brazilian Vellozia (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany*, 97(4), 585-592.
- Frankham, R. (1995). Conservation genetics. *Annual review of genetics*, 29(1), 305-327.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological conservation*, 126(2), 131-140.
- Gene Code Corporation (2012). Sequencher: Demos version. < <http://genecodes.com/>>
- Gill, P., Jeffreys, A. J., & Werrett, D. J. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318(6046), 577-579.
- Goldstein, D. B., & Schlotterer, C. (1999). Microsatellites: evolution and applications. 2-9p
- Gotelli, N. J. & Ellison, A. M. (2004). *A primer of ecological statistics* (Vol. 1). Sunderland: Sinauer Associates.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity*. 86(6). 485-486. <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>
- Goudet, J. (2002). FSTAT 2.9. 3.2. <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>
- Gould, S. J., & Vrba, E. S. (1982). Exaptation-a missing term in the science of form. *Paleobiology*, 4-15.
- Guidon, N., & Delibrias, G. (1986). Carbon-14 dates point to man in the Americas 32,000 years ago. *Nature*, 321(6072), 769-771.
- Hamilton, M. (2011). *Population genetics*. Wiley-Blackwell.
- Hamrick, J. L. (1982). Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany*. 1685-1693.
- Hamrick, J. L., & Schnabel, A. (1985). Understanding the genetic structure of plant populations: some old problems and a new approach. In *Population genetics in forestry* (pp. 50-70). Springer Berlin Heidelberg.
- Hedrick, P. W. (2011). *Genetics of populations*. Jones & Bartlett Learning.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*. 9(5). 1322-1332. <<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>>
- Hunter, R. L., & Markert, C. L. (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science (New York, NY)*, 125(3261), 1294.

<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> 30 abr 2013.

- Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: A language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics*, 5(3), 299-314.
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806. <<http://www.stanford.edu/group/rosenberglab/clumpp.html>>
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006), 67-73.
- Kalinowski, S. T. & Taper, M. L. (2006). Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 7(6), 991-995. <<http://www.montana.edu/kalinowski/Software/MLNullFreq.htm>>
- Kearns C. A. & Inouye, D. W. (1993). *Techniques for pollination biology*. University of Texas Press.
- Keeley, J. E., Pausas, J. G., Rundel, P. W., Bond, W. J., & Bradstock, R. A. (2011). Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in plant science*, 16(8), 406-411.
- Kijas, J. M. H., Fowler, J. C. S., Garbett, C. A., & Thomas, M. R. (1994). Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques*, 16(4), 656-662.
- Klink, C. A., & Machado, R. B. (2005). Conservation of the Brazilian cerrado. *Conservation Biology*, 19(3), 707-713.
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., & Rubel, F. (2006). World map of the Koppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, 15(3), 259-264.
- Krebs, P., Pezzatti, G. B., Mazzoleni, S., Talbot, L. M., & Conedera, M. (2010). Fire regime: history and definition of a key concept in disturbance ecology. *Theory in Biosciences*, 129(1), 53-69.
- Lande, R. (1988). Genetics and demography in biological conservation. *Science(Washington)*, 241(4872), 1455-1460.
- Ledru, M. P. (2002). Late Quaternary history and evolution of the cerrados as revealed by palynological records. *The cerrados of Brazil-Ecology and natural history of neotropical savanna*. (PS Oliveira & RJ Marquis, eds.). Columbia University Press, New York, 33-50.
- Lewis, P. O. & Zaykin, D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*, 11(12), 2453-2465.
- Lousada, J. M., Borba, E. L., Ribeiro, K. T., Ribeiro, L. C., & Lovato, M. B. (2011a). Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica*, 139(4), 431-440.
- Lousada, J. M., Lovato, M. B., & Borba, E. L. (2013). High genetic divergence and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian campos rupestres. *Brazilian Journal of Botany*, 1-9.

- Loveless, M. D. & Hamrick, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics*. 15. 65-95.
- Markert, C. L. (1975). Biology of isozymes. *Bioscience*, 365-368.
- Martins W.S., Lucas D.C.S., Neves K.F.S. & Bertioli D.J. (2009) WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development. *Bioinformation*. 3,282-283.
- Mello-Silva, R. 2013. *Velloziaceae* In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21388>>
- Menges, E. S., & Dolan, R. W. (1998). Demographic viability of populations of *Silene regia* in midwestern prairies: relationships with fire management, genetic variation, geographic location, population size and isolation. *Journal of Ecology*, 86(1), 63-78.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*. 142(3). 1061-1064.
- Mittermeier, R. A., Myers, N., Thomsen, J. B., Da Fonseca, G. A., & Olivieri, S. (1998). Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conservation biology*, 12(3), 516-520.
- MMA – Ministérios do Meio Ambiente
<<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado/mapa-de-cobertura-vegetal>> 30 abr 2013.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American naturalist*. 283-292.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70(12). 3321-3323.
- Nei, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of human genetics*. 41(2). 225-233.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89(3). 583-590.
- Oliveira, P. D., Gibbs, P. E., & Bianchi, M. (1991). Pollination and breeding system of *Vellozia squamata* (Liliales: Velloziaceae): a species of the Brazilian cerrados. *Bot. Acta*, 104, 392-8.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., & Vieira, M. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294-307.
- Osborne, C. P., & Beerling, D. J. (2006). Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of C4 plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1465), 173-194.
- Pausas, J. G., & Keeley, J. E. (2009). A burning story: the role of fire in the history of life. *BioScience*, 59(7), 593-601.
- Pessenda, L. C., Valencia, E. P. E., Aravena, R., Telles, E. C. C., & Boulet, R. (1998). Paleoclimate studies in Brazil using carbon isotopes in soils. In *Environmental Geochemistry in the Tropics* (pp. 7-16). Springer Berlin Heidelberg.
- Pivello, V. R., & Coutinho, L. M. (1992). Transfer of macro-nutrients to the atmosphere during experimental burnings in an open cerrado (Brazilian savanna). *Journal of Tropical Ecology*, 8(4), 487-497.

- Pivello, V. R., Scariot, A., SOUSA-SILVA, J. C., & Felfili, J. M. (2005). Manejo de fragmentos de Cerrado: princípios para a conservação da biodiversidade. Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 401-413.
- Pivello, V. R., Oliveras, I., Miranda, H. S., Haridasan, M., Sato, M. N., & Meirelles, S. T. (2010). Effect of fires on soil nutrient availability in an open savanna in Central Brazil. *Plant and soil*, 337(1-2), 111-123.
- Pivello, V. R. (2011). The use of fire in the Cerrado and Amazonian rainforests of Brazil: past and present. *Fire ecology*, 7(1), 24-39.
- Premoli, A. C., & Kitzberger, T. (2005). Regeneration mode affects spatial genetic structure of *Nothofagus dombeyi* forests. *Molecular Ecology*, 14(8), 2319-2329.
- Premoli, A. C., & Steinke, L. (2008). Genetics of sprouting: effects of long-term persistence in fire-prone ecosystems. *Molecular Ecology*, 17(17), 3827-3835.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155(2). 945-959.
- Prous, A. (1991). *Arqueologia brasileira*. Editora Universidade de Brasília.
- R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramos-Neto, M. B., & Pivello, V. R. (2000). Lightning fires in a Brazilian savanna National Park: rethinking management strategies. *Environmental Management*, 26(6), 675-684.
- Ratter, J. A., Ribeiro, J. F., & Bridgewater, S. (1997). The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, 80(3), 223-230.
- Reserva Ecológica do IBGE – RECOR <<http://www.recor.org.br/>> 01 maio 2013.
- Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A., & Feldman, M. W. (2002). Genetic structure of human populations. *Science*. 298(5602), 2381-2385.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 137-138.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*. 8(1). 103-106. <<http://genepop.curtin.edu.au/>>
- Rozen S. & Skaletsky H.J. (2000) 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*. Humana Press, Totowa. p. 365-386.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-4.
- Salgado-Labouriau, M. L., & Ferraz-Vicentini, K. R. (1994). Fire in the Cerrado 32,000 years ago. *Current Research in the Pleistocene*, 11, 85-87.
- Salgado-Labouriau, M. L., Barberi, M., Ferraz-Vicentini, K. R., & Parizzi, M. G. (1998). A dry climatic event during the late Quaternary of tropical Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 99(2), 115-129.
- Sambrook, J., Williams, J., Sharp, P. A., & Grodzicker, T. (1975). Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Journal of molecular biology*, 97(3), 369-390.
- Schiller, G., Ne'eman, G., & Korol, L. (1997). Post-fire vegetation dynamics in a native *Pinus halepensis* Mill. forest on Mt. Carmel, Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*, 45(4), 297-308.

- Schmitz, P. I. (1993). Caçadores e coletores antigos da região do Cerrado. *Cerrado. Caracterização, ocupação e perspectivas*, Pinto MN (Org). Ed. Univ. de Brasília, 109-154.
- Schrey, A. W., Fox, A. M., Mushinsky, H. R., & McCoy, E. D. (2011). Fire increases variance in genetic characteristics of Florida Sand Skink (*Plestiodon reynoldsi*) local populations. *Molecular Ecology*, 20(1), 56-66.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics*, 5(1), 63-69.
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9(5), 615-629.
- Simon, M. F., Grether, R., de Queiroz, L. P., Skema, C., Pennington, R. T., & Hughes, C. E. (2009). Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20359-20364.
- Simon, M. F., & Pennington, T. (2012). Evidence for adaptation to fire regimes in the tropical savannas of the Brazilian Cerrado. *International Journal of Plant Sciences*, 173(6), 711-723.
- Slatkin, M. (1985). Gene flow in natural populations. *Annual review of ecology and systematics*, 16, 393-430.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139(1). 457-462.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), 503-517.
- Spruyt, M & Buquicchio, F (1994) Gene Runner – version 3.05 Free. Hastings Software. <<http://www.generunner.net/>>
- Tautz, D., & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*, 12(10), 4127-4138.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16), 6463-6471.
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., & McCouch, S. (2001). Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome research*, 11(8), 1441-1452.
- US government (2010). <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>>
- Verdú, M. (2000). Ecological and evolutionary differences between Mediterranean seeders and resprouters. *Journal of Vegetation Science*, 11(2), 265-268.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 1358-1370.
- Whitlock, C., Higuera, P. E., McWethy, D. B., & Briles, C. E. (2010). Paleoecological perspectives on fire ecology: revisiting the fire-regime concept. *Open Ecol J*, 3, 6-23.
- Wyman, A. R., & White, R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6754-6758.
- Wright, S. (1922). Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist*. 56(645). 330-338.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of eugenics*. 15(1). 323-354.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 395-420.

- Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413-418.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11(1), 1-16.
- Zucchi, M. I. (2002). Análise da Estrutura Genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba.

ANEXO 1: Protocolo CTAB para extração de DNA em microtubo (Doyle & Doyle 1990, adaptado)

1. Adicionar em um microtubo (2mL) 200-500mg de tecido liofilizado e triturado (aproximadamente 0,25mL no microtubo);
2. Adicionar 800µL de tampão de extração CTAB pré-aquecido a 60-65°C no microtubo com as amostras;
3. Deixar as amostras em banho-maria (60-65°C) por no mínimo uma hora e agitar manualmente a cada 15 min. Retirar do banho-maria e esperar atingir a temperatura ambiente;
4. Adicionar 700-750µL de clorofórmio-isoamílico (CIA 24:1). Agitar os microtubos por 5 min. ou 300 vezes;
5. Centrifugar por 10 min. a 12.10^3 rpm;
6. Transferir todo sobrenadante para novos microtubos (1,5mL). Evitar a transferência de qualquer proteína denaturada presente na interface;
7. Repetir os itens 4, 5 e 6;
8. Adicionar 600µL de álcool isopropílico gelado concentrado e 200µL de acetato de amônio (7,5M). Misturar gentilmente até formar “pellet”. Coloque os tubos no congelador a -20°C por no mínimo 60 min.;
9. Centrifugar os tubos por 10 min. a 12.10^3 rpm;
10. Gentilmente, descartar o máximo de sobrenadante invertendo-o do tubo sem perder o “pellet”;
11. Adicionar 600µL de álcool etílico 70% para lavar o pellet e deixar imerso por 5-10 min., invertê-lo gentilmente;
12. Centrifugar os tubos durante 5-10min a 12.10^3 rpm;
13. Retirar o máximo de álcool etílico 70% sem perder o “pellet”;
14. Adicionar 600µL de álcool etílico absoluto para lavar o “pellet”, invertê-lo gentilmente;
15. Centrifugar os tubos durante 5-10 min. a 12.10^3 rpm;
16. Retirar o máximo de álcool etílico e deixar secar ao ar livre ou por uma hora em banho-maria seco a 37°C;
17. Eluir o “pellet” em 100µL de tampão TE (Tris-HCl 1M e pH 8,0; EDTA 0,5M e pH 8,0) e Adicionar 1µL (10mM) ou 2µL (2,5mM) de RNase;

18. Colocar em banho-maria por no mínimo uma hora ou por 12 horas ou mais a temperatura ambiente para a RNase agir; ou
19. Se necessário aplicar o protocolo de limpeza de DNA.

Protocolo de Limpeza de DNA com Acetato de Amônio

1. Precipitar o DNA em solução de acetato de amônio 7,5M gelado (50µL para cada 100µL de solução a ser precipitada) e álcool etílico absoluto a -20°C (375µL para 100µL de solução a ser precipitada). Homogeneizar;
2. Para favorecer a precipitação do DNA, deixar por 1 a 2 horas à -20°C ou 12 horas ou mais à -4°C;
3. Centrifugar a 12.10^3 rpm por 10 min.;
4. Retirar o máximo de álcool etílico e deixar secar ao ar livre ou por uma hora em banho-maria seco a 37°C;
5. Eluir o “pellet” em 100µL de tampão TE (Tris-HCl 1M e pH 8,0; EDTA 0,5M e pH 8,0) e Adicionar 1µL (10mM) ou 2µL (2,5mM) de RNase.

Tampão de Extração - CTAB

Estoque:	Conc. final	Vol. final (50mL)
CTBA	1-2%	0,5-1,00g
NaCl (5M)	1,42M	12,5mL
EDTA(pH 8,00 e 0,5M)	20,00mM	2,00mL
Tris-HCl (pH 8,00 e 1M)	100mM	5,00mL
PVP 40	2%	1,00g
β-mercaptoetanol	2-4%	1,0- 2,50mL
H ₂ O deionizada (qsp)	---	28,0mL

- Preparar o **tampão** no momento do uso e incubar a 65°C até o PVP dissolver
- Adicionar o β-mercaptoetanol somente no momento em que distribuir o tampão na amostra.

Quantificação do DNA Genômico

A determinação da concentração após a extração segue as seguintes etapas:

1. Preparação de gel de agarose a 1% em solução de Sybergreen (TBE 1X);
2. Utilização 4 μ L de azul de brometo de etídeo em 3 μ L de DNA;
3. Utilização de lambdas em diferentes concentrações, sendo o mínimo de 25 λ .

Cada microlitro de lambda corresponde ao valor do marcador em uso, por exemplo: um microlitro de 25 λ corresponde a 25ng/ μ L de DNA. Para aumentar o valor do marcador de 25 λ , por exemplo, basta aumentar a quantidade em microlitro em que essa corresponderá ao valor n vezes. Exemplo:

Para 25 λ $\rightarrow$ 1 μ L = 25 ng/ μ L de DNA $\rightarrow$ 2 μ L = 50 λ (25 λ + 25 λ) = 50 ng/ μ L de DNA $\rightarrow$ assim sucessivamente

ANEXO 2: Código para Programa R de sorteio amostral

```
dados<-read.csv("GPool_sample.csv",header=T,sep=";")
dados
P1<-sample(1:103,62,rep=F)
P1
P2<-sample(1:103,62,rep=F)
P2
P3<-sample(1:104,62,rep=F)
P3
P4<-sample(1:105,62,rep=F)
P4
P5<-sample(1:100,62,rep=F)
P5
P6<- sample(1:101,62,rep=F)
P6
gpool<-matrix(c(P1,P2,P3,P4,P5,P6),nrow=62,ncol=6)
gpool
```


ANEXO 3: Locos de microssatélites (SSR) selecionados a partir dos seguimentos de DNA sequenciados de *Vellozia squamata* Pohl. A primeira coluna é o nome loco do SSR, seguido do motivo e por fim sua classificação quanto ao tipo. Na terceira coluna está desenho par dos iniciadores, sense (s) e antisense (as), dos SSRs e na quarta o número de acesso à sequência no GeneBank.

Loco	Motivo	Tipo	Sense (s)/Antisense (as)	Acesso GeneBank
Vsq1	(GA) ₂₈	Perfeito	s:CGTGGACTAACCTCCCCTTA as: GTATGCCCCGACCAATGTC	KC990043
Vsq2	(GA) ₂ GT(GA) ₇ CA(GA) ₂ “(CA) ₇ (GA) ₃	Composto imperfeito	s:CTTCATCTCCTCTGGGTGCT as:AAGATTCCGCCTCAGTGCT	KC990044
Vsq3	(GT) ₈ “(CA) ₅	Perfeito	s:TGAGTGGAAGGGGAATAGT as:TGGGGCTTGGAATAGTATGG	KC990045
Vsq4	(TG) ₁₄	Perfeito	s:CAAATGAGTGAGTTGGAAAGG as:TTGGGGTTGGCAAAATGTA	KC990046
Vsq5	(CA) ₉ (CT) ₉	Composto	s:GCCGCTGCTACTTCAAACT as:TGATCTAAATGCCAACGACAG	KC990047
Vsq6	(CA) ₉	Perfeito	a:GCCAACTACCGTGCTCATC as:TGTATCTTCCTAGCCGAATCTT	KC990048
Vsq7	(TG) ₇	Perfeito	a:AGGCAAATGGACTTGGACTT as:GGGTTTTGAGAAGGGTGTG	KC990049
Vsq8	(GT) ₅ “(CA) ₂ T(CA) ₆ CTT(CA) ₇	Perfeito interrompido	a:TGTTTTGTTGAGAGGGTGTG as:TGCATGTGTGTTTGTAGACCA	KC990050
Vsq9	(CA) ₃ A(CA) ₉	Imperfeito	a:GACGGTGGAATACGGAGAAA as:GCAAATGAATGGAAGTTGGA	KC990051
Vsq10	(TA) ₃ CA(TA) ₃	Imperfeito	a:CCGATGAATAGTGCCGAAA as:GAGGACCGAATCCCCTAAGT	KC990051
Vsq11	(AC) ₁₁ ATA(CA) ₁₀ (ACA) ₉	Composto interrompido	a:ATCATCCACACGCTCCTCTT as:CATCTATCCTCCCCAAACCA	KC990052
Vsq12	(CA) ₅ “(TG) ₄ AG(TG) ₃	Perfeito interrompido	a:TGGGGAGGATAGATGTAGACAA as:GGTCTCAATCATGCAAAATACC	KC990052
Vsq13	(AC) ₇	Perfeito	a:GCGTGGACTATCCCTACTCA as:AGTTTAGATGCCAGACCATCAT	KC990053
Vsq14	(TG) ₈ “(TG) ₃ “(TA) ₅ TGT(AG) ₁₀	Perfeito Composto interrompido	a:TGGCTATGAAGGTTTTTCACAA as:TGGAGAACTGTTACTTTGCTCA	KC990054
Vsq15	(CA) ₄ “(CA) ₇ “(AC) ₃ “(AC) ₂	Perfeito	a:TAATCACAAAGCACGGTTGG as:GAAGAGGAGCGTGTGGATG	KC990055

Loco	Motivo	Tipo	Sense (s)/Antisense (as)	Acesso GeneBank
Vsq16	(AC) ₁₃ AT(AC) ₃	Imperfeito	a:TCTTCAGTTTGTTCAGGATG	KC990056
Vsq17	TTA(TTG) ₂ TTA(TTG) ₃	Imperfeito	a:TGTTGATGAAGGCAAGGAAG as:TTGAACCACGATTTCTCAGC	KC990057
Vsq18	(CA) ₄ CG(CA) ₃	Imperfeito	a:CAAGCAGCACCTAGACACAC as:GGGATTCTTGGCTATTCACTG	KC990058
Vsq19	(AC) ₈	Perfeito	a:GAAAGGTGGAGCAACTGAGC as:TGAAACCGCCAAAATCATC	KC990059
Vsq20	(GT) ₇ T(GT) ₂	Imperfeito	a:GCGATGTTGTTTGTGATGG as:GGGAGAGGAAATGAAATGAAG	KC990060
Vsq21	(GT) ₆ ···(CA) ₅ TG(CA) ₅	Perfeito Imperfeito	a:AGAATGCGGAGAAATCAAGG as:AAGGCAAATGGATGAGGTTG	KC990061
Vsq22	(CA) ₃ TATACACCAC(CA) ₇	Interrompido	a:AATGGAGCCTTTGAGAGGAG as:CGATGTTATTTGTGATGGAACC	KC990062
Vsq23	(TG) ₃ CA(TG) ₅ ···(AC) ₇ C(AC) ₁	Imperfeito	a:TGGGGCTTGGAGTAGTATGG as:GGTAGAATGCGGAGAAATCG	KC990063
Vsq24	(CA) ₈	Perfeito	a:AGAAGTGGGAGCCTTTGTGC as:GTGTTTCGGCACTATTCATCG	KC990064
Vsq25	(AC) ₇ A(AC)	Imperfeito	a:GGCTAAGGCATTTGGATTGG as:TGGAAGGGTGAATAGTGTTGG	KC990065
Vsq26	(AC) ₁₀	Perfeito	a:GTTGATGGTATTCGGGTTCCG as:CTCTTCCCCCTTCCTTTCC	KC990066
Vsq27	(CA) ₁₂	Perfeito	a:GAATGTCCTGCCAGAGTCC as:ATGGCTCCCAAACCTTTTCC	KC990067
Vsq28	(CA) ₆	Perfeito	a:CACGGATATAGGCATTCTCG as:TTTTGAAAGCGAGGGATAGC	KC990068
Vsq29	(GA) ₆	Perfeito	a:TTGCTTGGCTCTGTACTTCC as:TCTTGACTTCGGTTTACATGC	KC990069
Vsq30	(AC) ₁₀ ···(TG) ₂ TA(TG) ₄	Perfeito Imperfeito	a:GATCATGTTTCTTCGGTTTGG as:GGATCATTGACTCTCTCAAAGC	KC990070
Vsq31	(CA) ₇ C(CA) ₃	Imperfeito	a:AGAGGAGTGGTGTGTTGTGG as:GACTTGAACCTGGAACATTGG	KC990071
Vsq32	(CA) ₁₁	Perfeito	a:AGTCGTCTGGATTGTTGACC as:TCCCCCATTAGATACTGTGC	KC990072
Vsq33	(AG) ₆ ATG(CA) ₁₃	Interrompido	a:TGGTATGCGTCTTTTATGTGG as:TTACGGACCCATCAATAAGC	KC990073
Vsq34	(CT) ₁₅	Perfeito	a:AATGATCCGACCTTATTCACC as:TCAACCCACGATCTTTTGG	KC990074
Vsq35	(CA) ₆	Perfeito	a:TGTTGCCAATACGACATTCC as:GACAACAAGTTCCCTTTTGC	KC990075
Vsq36	(GT) ₆	Perfeito	a:ATAACCGGCATTGAGATCG as:CGGACAACCTCATCACTACC	KC990076
Vsq37	(TG) ₈ T(TG) ₂	Imperfeito	a:TGGTTTGTGGTTTGTTTTGG	KC990077

Loco	Motivo	Tipo	Sense (s)/Antisense (as)	Acesso GeneBank
Vsq38	(GA) ₁₁ ...(CT) ₅	Perfeito	as:GGAATCGCAAATTGAGTGG a:CGGGAAGTCCTAAGCAACC as:TTCAGAGAGAGAGCGTTTGG	KC990078
Vsq39	(AC) ₇	Perfeito	a:TCCTATGTGGGGATTATTTGC as:GGACTAGCCTTCAAGTATGACG	KC990079
Vsq40	(CA) ₄ (TA) ₅	Composto	a:GGGATATTGTGGGGATGG as:GAAAACAGAGAAAGAGCAGAGC	KC990080
Vsq41	(CA) ₄ (TA) ₅ ...(GT) ₅	Composto Perfeito	a:GGGATATTGTGGGGATGG as:TGCACACGAACTTTTACGG	KC990080
Vsq42	(CT) ₁ CC(CT) ₅ ...(AC) ₁₁ AT(AC) ₇	Imperfeito	a:CGATAGTGCAGCCAATGC as:GATTTTCGGGGAAAGTTGG	KC990081
Vsq43	(GT) ₆	Perfeito	a:TATTTTGAAAGCGAGGGATAGC as:CTCGATACTCACGGATATAGGC	KC990082
Vsq44	(TG) ₅ ...(AC) ₈ C(AC)	Perfeito Imperfeito	a:TGGGGCTTGGAATAGTATGG as:GTAGAATGCGGGAGAAATCG	KC990083
Vsq45	(GT) ₉ (GA) ₁₆	Composto	a:ACCTCGTCAACAGTGAGACC as:CTTCTTCAACCGCAACTCC	KC990084
Vsq46	(CT) ₂ CG(CT) ₃ ...(GT) ₂ TGTGA(GT) ₅	Imperfeito Interrompido	a:TTGGAGGGTTTGAACATGC as:CAGGCAAAACAGTGAGATCG	KC990085
Vsq47	(AC) ₃ AT(AC) ₈	Imperfeito	a:ATCATGCGTTCAAAAAGTTGG as:AGCCTGGAAACAGATGACC	KC990086
Vsq48	(CA) ₁₄	Perfeito	a:AGCAATTTAGTGATGGAGTTGG as:CGATGAAACAGGAACAATAAGG	KC990087
Vsq49	(CA) ₉ A(CA)	Imperfeito	a:CGAAGAAATGGTGGAAGAGG as:GTGGAACCTTTGGACTTGAGC	KC990088
Vsq50	(TG) ₂ A(TG) ₉	Imperfeito	a:CGGACAAATCTAGGAAGTGG as:GCCAAAGCTCTCAATAATGC	KC990089
Vsq51	(CA) ₇	Perfeito	a:GATGGTGGTGTGAGTTGTGG as:AACAAAGGAAGCCAAAAGAGC	KC990090

ANEXO 4: Tabela dos genótipos de 257 indivíduos distribuídos nos cinco tratamentos e na área adjacente ao tratamento (item 2.5.2). ID em que o primeiro número representa o tratamento e os três últimos são a identificação numérica do indivíduo. Bienal tardia = 1; bienal precoce = 2; bienal modal = 3; quadrienal modal = 4; controle = 5; e controle externo = 6. UTM (Universal Transversa de Mercator). Vsq11 a Vsqu48 com par de alelos dos locos de genotipados. NA é dado faltante.

ID	UTM		Vsq11		Vsq26		Vsq33		Vsq34		Vsq37		Vsq38		Vsq39		Vsq45		Vsq47		Vsq48	
1020	192904,326	8234331,503	237	245	184	184	224	228	169	173	NA	NA	209	209	NA	NA	NA	NA	215	225	NA	NA
1027	192922,950	8234301,856	215	231	184	184	224	236	161	161	303	303	207	207	273	273	NA	NA	213	223	230	238
1029	192925,200	8234294,134	229	243	184	184	210	224	NA	NA	NA	NA	207	217	NA	NA	NA	NA	215	225	NA	NA
1030	192925,184	8234295,241	229	229	184	184	224	236	157	173	305	305	207	207	273	273	NA	NA	213	223	238	238
1034	192954,343	8234356,557	229	229	184	184	210	224	161	161	303	303	207	207	NA	NA	244	244	215	225	238	238
1036	192968,255	8234357,856	235	235	180	180	NA	NA	161	161	285	303	207	211	265	269	NA	NA	215	223	230	236
1044	192990,357	8234386,957	231	249	184	184	226	238	161	175	303	303	213	213	NA	NA	NA	NA	217	223	230	230
1052	193049,493	8234372,265	235	235	184	184	224	230	159	169	293	303	207	217	269	275	222	244	213	223	228	242
1053	193047,396	8234368,914	235	253	184	184	218	230	159	171	303	303	207	217	269	275	NA	NA	213	221	228	242
1054	193048,437	8234371,143	225	231	178	184	208	194	159	175	303	303	207	209	265	271	244	244	213	223	242	242
1055	193048,452	8234370,036	225	231	178	184	208	194	159	175	293	293	207	209	271	275	222	244	213	223	242	242
1056	193047,381	8234370,021	221	235	180	180	208	192	159	159	303	303	207	211	273	273	222	244	213	225	242	242
1058	193047,320	8234374,450	231	249	184	184	226	232	159	159	303	303	211	211	267	267	222	246	213	223	236	236
1060	193049,432	8234376,695	235	235	178	178	208	232	159	171	303	303	203	217	265	273	212	234	211	219	226	226
1064	193049,493	8234372,265	213	229	184	184	210	226	169	177	301	301	203	213	265	269	222	242	211	221	236	236
1067	193045,116	8234378,850	221	239	180	180	226	232	169	179	303	303	205	213	269	275	212	234	213	223	236	236
1069	193035,185	8234399,757	227	247	180	180	212	226	151	159	303	303	211	217	261	269	234	246	NA	NA	234	234
1078	192988,138	8234392,464	215	231	184	184	212	228	179	179	303	303	207	211	269	275	224	248	213	213	238	238
1081	193004,421	8234377,183	215	231	180	180	212	226	177	177	303	303	207	211	265	271	232	248	211	211	238	238
1082	193007,665	8234375,012	NA	NA	178	178	208	208	159	169	303	303	217	217	265	273	224	246	211	221	NA	NA
1086	193033,332	8234378,688	211	227	178	184	212	228	157	157	303	303	217	217	265	271	222	246	NA	NA	238	238
1088	193039,775	8234377,669	213	221	180	184	212	228	169	177	303	303	211	211	269	275	222	242	NA	NA	NA	NA

ID	UTM		Vsq11		Vsq26		Vsq33		Vsq34		Vsq37		Vsq38		Vsq39		Vsq45		Vsq47		Vsq48	
1090	193007,219	8234329,597	213	229	184	184	212	228	159	169	303	303	211	211	265	271	246	246	NA	NA	238	238
1092	193002,705	8234346,148	215	227	180	184	228	232	159	159	303	303	209	213	267	271	222	246	NA	NA	NA	NA
1094	192981,076	8234282,720	221	237	178	184	228	234	159	173	303	303	207	207	267	275	246	246	NA	NA	NA	NA
1095	193062,257	8234379,086	233	249	178	184	210	194	159	175	303	303	207	211	269	269	230	230	NA	NA	NA	NA
1096	192973,501	8234288,154	213	229	180	184	212	228	159	159	303	303	203	213	265	269	238	250	213	223	238	238
1097	192974,572	8234288,169	225	229	184	184	228	234	159	167	303	303	203	211	271	275	202	224	213	223	238	238
1098	192974,557	8234289,276	213	231	180	184	228	234	159	159	303	303	203	213	269	275	238	250	213	223	230	236
1099	192971,404	8234284,802	213	229	180	184	212	228	159	159	303	303	209	217	269	275	238	248	NA	NA	228	228
1100	192969,276	8234283,665	221	239	180	184	228	242	161	175	303	303	211	211	269	275	220	242	211	221	228	228
1101	192974,603	8234285,954	231	239	180	180	228	234	153	153	303	303	211	217	267	275	224	238	213	213	228	228
1102	192972,460	8234285,924	239	245	184	184	210	228	153	175	303	303	203	203	NA	NA	224	224	213	223	NA	NA
2007	192851,778	8234490,265	219	227	NA	NA	228	234	159	159	303	303	NA	NA	NA	NA	NA	NA	211	221	NA	NA
2009	192853,951	8234488,080	227	251	NA	NA	218	234	177	177	NA	NA	209	209	NA	NA	232	232	213	223	238	238
2039	192759,361	8234353,872	241	241	180	184	214	228	155	171	291	303	207	213	267	273	224	246	213	223	230	230
2045*	192862,422	8234339,786	213	229	180	184	234	246	159	159	303	303	209	213	265	273	204	226	213	223	238	238
2051	192870,978	8234341,011	213	229	184	184	214	228	159	159	303	303	207	209	263	269	224	248	213	223	238	238
2054	192871,988	8234345,456	219	237	178	184	228	240	159	159	303	303	213	213	269	277	250	250	213	223	238	238
2055	192871,988	8234345,456	229	249	184	184	212	228	159	159	303	303	207	213	269	275	248	248	215	221	238	238
2056	192873,029	8234347,685	233	249	184	184	212	228	159	159	303	303	207	209	NA	NA	226	248	215	223	238	238
2058	192877,314	8234347,744	219	227	184	184	212	228	159	159	303	303	209	213	271	275	250	250	215	223	238	238
2059	192867,733	8234343,182	229	249	184	184	228	244	159	159	303	303	207	217	NA	NA	250	250	215	223	230	238
2060	192867,749	8234342,075	229	249	NA	NA	212	228	159	159	NA	NA	207	217	NA	NA	230	230	215	223	232	232
2062	192864,519	8234343,138	219	235	184	184	226	226	157	157	303	303	207	217	277	277	244	244	213	223	230	238
2064	192864,596	8234337,601	213	223	184	184	212	226	155	155	303	303	207	207	275	275	224	224	215	225	230	230
2065	192861,382	8234337,557	229	229	184	184	228	228	155	155	303	303	213	217	NA	NA	NA	NA	217	225	NA	NA
2071	192855,949	8234343,020	225	225	NA	NA	228	228	NA	NA	295	295	209	215	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2072	192854,893	8234341,897	215	215	NA	NA	228	240	NA	NA	297	297	209	209	NA	NA	NA	NA	NA	NA	232	238
2074	192848,480	8234340,702	217	217	176	186	228	240	NA	NA	NA	NA	206	217	NA	NA	212	222	225	229	224	242

ID	UTM		Vsq11		Vsq26		Vsq33		Vsq34		Vsq37		Vsq38		Vsq39		Vsq45		Vsq47		Vsq48	
2081	192827,099	8234337,084	229	229	NA	NA	228	228	NA	NA	NA	NA	213	217	NA	NA	NA	NA	221	221	232	242
2082	192819,386	8234352,484	219	219	178	184	228	234	NA	NA	297	297	211	211	273	273	238	238	221	221	240	248
2084	192812,714	8234370,113	229	247	182	186	228	228	159	167	297	297	206	213	269	279	236	246	223	223	240	248
2085	192806,302	8234368,917	217	229	178	186	228	228	159	159	299	299	206	213	NA	NA	222	222	223	223	242	248
2086	192806,302	8234368,917	229	229	176	186	228	228	NA	NA	299	299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	223	223	242	248
2087	192807,358	8234370,039	223	223	182	182	228	228	159	169	299	299	213	213	NA	NA	248	248	223	223	232	240
2088	192807,358	8234370,039	229	229	174	186	228	228	161	161	295	295	206	206	NA	NA	236	248	223	223	232	240
2089	192805,215	8234370,009	229	229	178	186	228	242	NA	NA	295	295	211	211	NA	NA	218	228	223	223	242	248
2090	192806,241	8234373,346	229	229	NA	NA	228	234	NA	NA	299	299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	223	223	242	248
2091	192806,256	8234372,239	229	253	176	184	228	240	NA	NA	299	299	206	213	NA	NA	224	234	223	223	242	242
2092	192806,256	8234372,239	223	223	NA	NA	228	234	159	171	297	297	213	213	NA	NA	242	242	221	221	240	240
2093	192807,327	8234372,253	251	251	178	188	228	244	159	159	297	297	213	219	NA	NA	242	242	221	221	242	242
2095	192805,169	8234373,331	221	237	180	186	226	226	159	159	299	299	206	219	NA	NA	236	248	223	223	224	242
2097	192804,083	8234374,424	241	241	180	180	228	244	161	161	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	223	223	240	246
2100	192799,843	8234371,043	219	247	174	184	228	238	159	173	NA	NA	209	219	NA	NA	218	230	223	223	240	248
2101	192798,772	8234371,028	229	247	180	184	234	234	NA	NA	299	299	219	219	NA	NA	NA	NA	223	223	240	246
2102	192793,232	8234384,242	243	243	174	180	208	228	175	175	299	299	206	219	NA	NA	NA	NA	223	223	240	246
2104	192800,777	8234381,023	233	245	174	180	226	226	159	173	299	299	213	219	NA	NA	230	242	223	223	240	248
2105	192801,849	8234381,038	241	249	180	180	242	242	159	175	299	299	215	219	275	275	226	226	221	221	240	246
2107	192809,333	8234382,249	237	253	176	182	240	240	161	169	299	299	215	215	271	271	218	230	221	231	240	246
2108	192815,730	8234384,552	229	245	NA	NA	226	244	171	171	297	297	211	219	273	273	224	224	221	231	242	250
3005	192740,044	8234278,293	241	247	174	184	226	232	175	175	299	299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3006	192739,064	8234271,634	235	247	184	184	226	232	171	171	299	299	209	213	NA	NA	214	224	NA	NA	238	238
3007	192722,964	8234273,628	NA	NA	174	180	NA	NA	NA	NA	299	299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	221	221	238	246
3009	192717,561	8234276,876	NA	NA	176	180	NA	NA	NA	NA	299	299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	219	219	236	236
3010	192708,914	8234282,294	219	231	174	174	226	226	157	171	299	299	205	219	NA	NA	226	238	219	219	NA	NA
3011	192708,945	8234280,080	231	239	174	184	226	240	173	173	299	299	205	211	NA	NA	226	238	219	219	230	238
3013	192701,507	8234275,547	251	251	180	180	NA	NA	159	171	299	299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	217	217	240	248

ID	UTM		Vsq11		Vsq26		Vsq33		Vsq34		Vsq37		Vsq38		Vsq39		Vsq45		Vsq47		Vsq48	
3025	192657,448	8234362,436	249	249	180	180	240	240	157	165	299	299	209	209	NA	NA	NA	NA	219	219	220	238
3028	192710,309	8234336,583	243	255	NA	NA	226	226	165	175	299	299	211	211	NA	NA	222	232	221	221	220	248
3029	192712,421	8234338,827	235	255	180	180	226	226	159	179	299	299	213	217	273	273	234	238	221	221	246	246
3030	192713,477	8234339,949	235	235	180	180	226	226	157	157	299	299	215	215	269	269	234	246	221	221	238	244
3031	192528,843	8234363,985	227	247	180	180	232	238	159	179	299	299	206	211	NA	NA	226	232	219	219	234	244
3032	192527,787	8234362,863	229	249	NA	NA	226	232	159	169	299	299	211	215	NA	NA	214	226	221	221	236	236
3033	192534,260	8234359,630	229	247	NA	NA	205	226	159	159	299	299	206	219	269	269	244	244	221	221	240	240
3034	192536,281	8234368,518	227	249	180	180	226	238	NA	NA	299	299	219	219	NA	NA	NA	NA	223	223	222	222
3036	192540,719	8234357,504	227	235	NA	NA	226	226	NA	NA	NA	NA	209	213	NA	NA	NA	NA	223	223	NA	NA
3045	192575,505	8234321,435	235	235	180	180	230	238	157	157	NA	NA	211	219	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3047	192579,775	8234322,601	235	241	NA	NA	224	224	NA	NA	299	299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	238	238
3050	192581,811	8234330,382	247	247	NA	NA	238	238	NA	NA	299	299	NA	NA	NA	NA	230	240	223	223	NA	NA
3051	192769,229	8234259,867	235	247	NA	NA	205	240	159	159	299	299	215	215	271	271	238	252	223	223	NA	NA
3054	192601,349	8234156,767	225	249	180	180	224	224	159	179	299	299	206	213	273	273	238	252	223	223	220	238
3055	192606,644	8234161,270	227	249	NA	NA	224	236	151	159	299	299	206	213	273	273	238	250	221	221	238	248
3056	192605,558	8234162,363	239	247	NA	NA	224	238	157	157	299	299	209	219	271	271	240	252	219	219	238	238
3057	192604,502	8234161,241	237	247	NA	NA	224	224	157	157	299	299	211	219	NA	NA	250	250	219	221	236	236
3063	192615,798	8234196,838	239	247	180	180	224	238	175	175	299	299	206	213	273	273	248	248	219	219	234	242
3064	192616,823	8234200,175	227	235	180	180	224	238	159	159	295	295	211	211	271	271	228	246	219	219	238	238
3065	192616,823	8234200,175	239	239	NA	NA	224	224	157	157	293	299	209	219	275	275	NA	NA	217	217	240	246
3067	192619,012	8234196,882	241	241	NA	NA	224	224	157	175	299	299	209	209	269	269	NA	NA	217	225	238	244
3068	192617,956	8234195,760	NA	NA	180	180	NA	NA	155	159	299	299	NA	NA	NA	NA	234	252	221	221	238	246
3071	192628,699	8234193,693	231	249	174	184	224	236	NA	NA	297	297	211	215	NA	NA	NA	NA	221	221	240	244
3073	192627,536	8234200,322	227	247	176	186	205	238	NA	NA	299	299	213	213	273	273	240	252	219	219	244	248
3074	192625,394	8234200,293	239	239	180	184	224	248	157	175	299	299	211	215	275	275	228	240	213	213	238	238
3075	192620,052	8234199,112	239	239	178	186	224	224	159	175	299	299	213	219	NA	NA	240	252	221	221	238	238
3076	192620,037	8234200,219	217	239	174	180	224	230	159	173	299	299	206	213	213	235	236	250	221	221	NA	NA
3078	192626,496	8234198,093	225	245	176	176	205	238	157	167	299	299	213	219	273	273	NA	NA	213	219	228	240

ID	UTM	Vsq11	Vsq26	Vsq33	Vsq34	Vsq37	Vsq38	Vsq39	Vsq45	Vsq47	Vsq48
3080	192629,572 8234208,103	239 249	180 186	226 238	171 171	299 299	NA NA	NA NA	228 252	219 221	238 248
3081	192630,674 8234205,903	245 245	176 186	238 238	157 157	299 299	206 213	271 271	242 252	219 219	236 236
3082	192631,730 8234207,025	217 247	178 178	205 224	155 155	301 301	213 217	269 269	NA NA	219 219	236 242
3083	192631,700 8234209,240	NA NA	180 180	NA NA	NA NA	301 301	NA NA	NA NA	234 254	219 219	238 238
3084	192630,613 8234210,333	233 241	180 180	224 224	155 155	299 299	215 215	271 271	228 240	219 219	NA NA
3086	192632,771 8234209,255	217 235	182 182	226 232	163 171	301 301	209 211	NA NA	228 234	221 221	238 242
3088	192631,684 8234210,347	219 251	176 180	224 224	159 159	299 299	213 213	271 271	234 246	221 221	230 238
3091	192640,331 8234204,929	235 249	180 180	230 230	157 157	301 301	215 219	271 271	NA NA	221 221	230 240
3092	192628,455 8234211,410	241 247	176 184	226 238	157 157	301 301	209 221	271 271	224 236	219 227	240 248
3093	192630,583 8234212,547	239 247	NA NA	230 238	159 173	301 301	215 221	273 273	216 228	219 219	248 248
3096	192645,154 8234243,759	221 221	176 188	226 232	157 175	301 301	209 213	NA NA	232 244	223 223	240 246
3097	192665,402 8234251,791	221 245	180 180	226 232	157 157	301 301	213 213	271 271	230 242	223 223	238 248
3098	192679,344 8234250,876	225 239	180 180	226 232	157 177	303 303	217 221	265 265	244 244	223 223	242 248
3099	192679,299 8234254,198	213 223	176 182	226 238	157 157	303 303	211 217	275 275	238 250	225 225	232 238
3100	192680,217 8234265,286	231 243	172 182	208 226	159 159	301 301	219 219	NA NA	238 250	223 223	240 240
3101	192683,401 8234267,545	225 245	182 182	208 232	153 173	NA NA	221 221	273 277	228 238	221 221	242 248
3103	192696,272 8234266,615	227 235	182 188	208 226	157 167	301 301	209 209	NA NA	238 250	223 223	232 238
3105	192703,817 8234263,396	239 245	178 184	232 232	157 157	NA NA	213 217	265 265	226 244	223 227	232 238
4004	192807,964 8234248,218	243 243	182 182	232 240	NA NA	NA NA	206 215	NA NA	NA NA	205 241	NA NA
4018	192832,647 8234167,707	NA NA	182 182	226 226	159 175	NA NA	209 209	271 277	224 234	219 219	NA NA
4023	192739,900 8234133,203	NA NA	182 182	228 240	159 159	303 303	209 209	NA NA	240 240	221 221	NA NA
4024	192736,701 8234132,052	NA NA	NA NA	NA NA	161 161	303 303	NA NA	NA NA	242 242	221 221	NA NA
4025	192733,518 8234129,793	223 227	182 182	228 228	159 159	303 303	209 209	NA NA	242 248	221 221	NA NA
4026	192734,482 8234137,559	213 219	180 180	238 238	167 171	303 303	209 221	NA NA	244 244	221 221	238 238
4027	192736,610 8234138,696	213 219	180 208	232 238	161 171	303 303	209 217	271 271	246 246	221 221	NA NA
4028	192732,385 8234134,207	225 249	180 188	226 226	159 159	303 303	209 209	275 275	222 242	223 223	226 238
4029	192738,661 8234145,369	213 219	NA NA	226 232	159 159	303 303	211 213	273 275	234 234	221 221	224 238
4033	192728,054 8234137,470	225 231	182 196	226 226	161 169	303 303	211 213	NA NA	224 224	219 219	236 240

ID	UTM		Vsq11		Vsq26		Vsq33		Vsq34		Vsq37		Vsq38		Vsq39		Vsq45		Vsq47		Vsq48	
4034	192725,866	8234140,763	229	249	182	202	228	240	177	177	303	303	219	219	NA	NA	224	224	219	219	226	238
4036	192720,174	8234165,050	217	235	180	180	226	240	159	159	303	303	211	217	275	275	224	242	219	219	232	236
4037	192718,046	8234163,913	NA	NA	178	184	226	226	159	173	303	303	209	215	271	271	224	240	221	221	NA	NA
4039	192715,873	8234166,098	225	243	180	200	208	232	161	161	303	303	211	221	271	277	230	230	219	219	222	236
4040	192698,869	8234155,896	229	259	182	200	208	226	159	169	303	303	211	213	275	275	230	230	221	221	NA	NA
4041	192693,543	8234153,608	229	257	180	200	226	226	161	175	303	303	211	213	273	273	232	242	221	221	236	236
4042	192694,645	8234151,408	225	243	176	182	226	232	161	175	303	303	209	215	271	271	234	234	221	221	NA	NA
4043	192691,370	8234155,793	NA	NA	176	184	NA	NA	161	177	303	303	NA	NA	NA	NA	232	232	221	221	236	240
4045	192688,187	8234153,534	235	235	182	186	226	236	155	155	303	303	NA	NA	NA	NA	232	232	221	221	NA	NA
4046	192693,314	8234170,218	NA	NA	180	200	226	226	159	159	303	303	215	215	273	281	232	232	221	221	NA	NA
4047	192677,260	8234168,889	235	243	176	184	226	232	177	177	303	303	213	221	261	273	248	248	219	223	NA	NA
4048	192675,087	8234171,074	223	223	180	180	226	226	153	159	303	303	NA	NA	267	271	232	248	213	219	226	236
4051	192844,599	8234155,689	243	243	182	182	238	238	159	159	303	303	207	217	275	275	230	230	221	221	NA	NA
4053	192855,541	8234139,227	227	245	180	192	208	226	159	159	303	303	209	215	271	271	242	248	221	221	NA	NA
4055	192853,414	8234138,090	241	245	182	182	226	238	159	159	303	303	209	221	NA	NA	250	250	221	221	NA	NA
4056	192852,388	8234134,753	223	223	182	192	232	238	177	177	NA	NA	209	221	271	271	250	250	219	219	NA	NA
4059	192757,850	8234074,751	243	243	176	182	205	230	159	159	NA	NA	207	215	269	269	224	224	219	219	NA	NA
4060	192755,707	8234074,721	237	245	180	180	230	240	157	171	NA	NA	213	219	267	273	240	240	219	219	NA	NA
4062	192753,625	8234070,263	241	241	176	182	230	230	169	179	NA	NA	213	213	271	271	240	240	219	219	NA	NA
4067	192708,249	8234097,326	227	233	182	182	205	205	169	169	303	303	207	213	269	273	234	234	221	221	NA	NA
4070	192712,503	8234099,600	225	225	170	182	230	230	169	169	NA	NA	213	219	269	273	226	244	219	219	NA	NA
4073	192691,092	8234098,197	217	241	182	182	224	238	159	173	303	303	207	213	269	269	244	244	221	221	NA	NA
4075	192697,352	8234110,466	221	227	176	182	224	224	157	169	303	303	213	213	273	273	232	232	219	219	NA	NA
4076	192697,230	8234119,325	217	241	176	182	224	230	157	157	NA	NA	213	213	271	271	240	240	219	219	NA	NA
4078	192682,552	8234095,864	227	227	180	180	205	224	171	171	303	303	211	219	265	273	250	250	221	221	NA	NA
4081	192668,518	8234103,423	237	237	176	182	224	234	167	167	303	303	213	213	269	273	232	250	219	219	NA	NA
4087	192671,626	8234111,219	NA	NA	182	182	230	236	155	155	303	303	213	219	271	271	246	246	221	221	NA	NA
4090	192669,513	8234108,975	NA	NA	180	180	230	236	153	153	NA	NA	213	213	269	269	244	244	219	219	NA	NA

ID	UTM		Vsq11		Vsq26		Vsq33		Vsq34		Vsq37		Vsq38		Vsq39		Vsq45		Vsq47		Vsq48	
4092	192672,682	8234112,341	NA	NA	180	180	224	236	155	159	303	303	207	213	273	273	222	228	217	221	NA	NA
4093	192671,595	8234113,434	NA	NA	176	182	224	234	157	157	NA	NA	207	207	269	273	228	232	219	219	NA	NA
4096	192681,161	8234119,103	227	247	174	178	205	230	155	155	303	303	207	211	NA	NA	232	232	209	219	NA	NA
4097	192681,130	8234121,318	229	247	180	180	226	226	157	177	NA	NA	205	211	269	269	240	246	221	221	NA	NA
4098	192697,078	8234130,398	225	225	176	182	205	238	159	169	303	303	207	213	NA	NA	NA	NA	219	219	NA	NA
5002	192637,386	8234418,644	233	245	180	180	224	236	157	171	303	303	213	219	269	269	248	248	219	219	236	236
5004	192646,033	8234413,225	NA	NA	176	180	205	238	159	173	NA	NA	213	219	269	269	228	242	221	221	226	238
5009	192644,549	8234443,108	223	245	180	180	205	238	159	169	NA	NA	207	211	273	273	234	234	219	219	224	238
5011	192642,376	8234445,293	223	245	176	186	224	236	159	169	303	303	207	211	273	273	234	234	221	221	224	238
5012	192620,507	8234477,111	225	245	176	182	224	230	173	181	NA	NA	207	211	NA	NA	248	248	219	219	238	242
5014	192624,731	8234481,599	243	243	178	190	205	238	157	169	305	305	211	211	265	265	246	246	221	221	236	236
5015	192625,909	8234473,863	243	243	180	180	230	230	159	171	303	303	205	211	273	273	250	250	221	221	232	236
5016	192630,976	8234494,976	229	229	176	184	224	236	159	167	303	303	215	215	269	269	240	240	213	221	226	226
5017	192636,302	8234497,264	217	227	184	184	205	236	157	157	NA	NA	213	213	275	275	254	254	221	221	226	236
5018	192634,144	8234498,342	223	223	178	186	205	230	167	167	NA	NA	205	219	271	271	248	248	221	221	238	238
5020	192637,114	8234516,104	NA	NA	178	192	224	224	NA	NA	NA	NA	211	215	NA	NA	252	252	223	223	238	238
5023	192623,187	8234515,912	229	235	180	180	224	230	157	163	303	303	211	219	267	273	242	242	223	223	236	242
5028	192603,246	8234563,261	227	227	180	180	224	224	157	157	305	305	207	211	269	269	230	230	213	221	240	240
5029	192612,614	8234583,326	235	235	180	180	205	230	157	173	303	303	215	219	267	271	246	246	223	223	228	236
5030	192575,987	8234519,691	225	249	174	186	224	224	157	157	305	305	211	215	265	271	236	236	221	221	234	234
5032	192574,503	8234549,574	235	235	176	184	224	224	161	169	303	303	211	215	265	269	248	248	221	221	232	236
5034	192572,300	8234553,974	215	249	176	184	205	230	157	157	NA	NA	215	219	273	273	230	230	221	221	228	236
5035	192577,672	8234552,941	223	249	180	180	230	230	157	157	303	303	211	215	265	271	240	240	221	221	NA	NA
5036	192584,023	8234558,566	245	245	178	188	224	224	159	167	303	303	209	217	271	271	248	248	221	221	240	240
5037	192571,091	8234563,925	233	241	178	186	224	224	159	171	303	303	205	213	271	275	240	244	213	221	232	232
5038	192568,979	8234561,681	231	243	180	180	226	230	159	159	305	305	213	213	271	281	240	254	219	219	236	236
5039	192571,198	8234556,174	223	227	178	184	230	230	159	175	303	303	213	213	273	277	240	240	223	223	228	238
5040	192563,897	8234541,675	215	249	178	184	226	226	159	167	305	305	213	219	267	271	236	236	213	223	238	238

ID	UTM		Vsqa11		Vsqa26		Vsqa33		Vsqa34		Vsqa37		Vsqa38		Vsqa39		Vsqa45		Vsqa47		Vsqa48	
5042	192534,021	8234532,403	227	241	182	194	226	236	161	161	305	305	211	219	271	271	224	224	221	221	228	228
5043	192517,079	8234517,772	221	221	178	184	224	224	153	169	NA	NA	207	213	NA	NA	236	236	221	221	238	242
5044	192517,155	8234512,235	223	245	180	196	NA	NA	151	175	303	303	211	211	271	275	242	242	221	221	240	240
5048	192511,875	8234506,624	NA	NA	NA	NA	226	226	153	153	NA	NA	213	213	NA	NA	240	240	223	223	NA	NA
5051	192832,818	8234544,273	223	231	178	182	226	236	167	167	NA	NA	207	213	273	273	234	234	223	223	NA	NA
5053	192818,875	8234545,189	235	247	NA	NA	234	234	159	159	303	303	NA	NA	275	275	250	250	223	223	NA	NA
5054	192822,013	8234550,770	243	247	184	184	208	208	159	159	NA	NA	211	219	275	275	230	250	223	223	NA	NA
5055	192813,457	8234549,544	239	239	184	184	208	226	157	157	NA	NA	209	215	271	271	234	234	223	223	NA	NA
5057	192810,274	8234547,285	237	237	172	184	226	230	157	157	NA	NA	211	215	NA	NA	224	234	223	223	240	240
5058	192813,488	8234547,329	229	241	178	184	226	226	157	157	303	303	215	215	273	273	234	234	223	223	NA	NA
5060	192811,391	8234543,978	223	229	182	182	208	226	157	157	NA	NA	213	213	273	275	228	228	223	223	NA	NA
5063	192808,131	8234547,256	223	231	184	184	203	240	157	157	NA	NA	213	213	273	273	242	248	223	223	NA	NA
5066	192807,334	8234527,309	223	245	184	200	208	232	155	155	299	299	206	206	273	277	232	242	227	227	NA	NA
5069	192808,055	8234552,792	235	249	182	206	208	228	159	175	301	301	206	206	277	277	228	232	225	225	NA	NA
5070	192811,269	8234552,837	NA	NA	NA	NA	210	228	NA	NA	303	303	213	213	NA	NA	NA	NA	225	225	240	240
5071	192806,846	8234562,744	235	243	182	206	234	234	159	159	301	305	213	213	275	275	226	228	225	225	NA	NA
5072	192807,918	8234562,758	235	243	182	182	210	234	159	159	307	307	205	205	277	277	232	238	225	225	NA	NA
5079	192785,908	8234527,014	247	247	182	200	228	234	159	159	305	305	205	205	269	277	230	236	227	227	NA	NA
5080	192788,081	8234524,829	227	227	184	184	210	230	159	159	303	303	213	213	275	275	228	246	225	239	244	244
5081	192785,954	8234523,692	227	227	184	184	210	234	161	161	305	305	213	213	275	275	240	244	225	225	230	244
5082	192783,811	8234523,662	229	229	184	200	240	240	161	175	305	305	213	213	275	279	236	236	225	225	246	246
5083	192785,954	8234523,692	227	239	184	200	228	242	157	157	307	307	213	213	275	275	244	250	225	225	242	242
5084	192781,622	8234526,955	229	229	186	186	212	230	159	171	305	305	213	213	273	279	244	250	227	227	244	244
5086	192776,174	8234533,525	247	247	186	186	228	230	157	175	305	305	215	215	277	277	246	246	227	227	240	246
5087	192771,889	8234533,466	235	235	186	186	212	230	157	157	305	305	215	215	275	275	238	238	219	227	NA	NA
5088	192774,047	8234532,388	235	247	184	204	228	228	157	157	305	305	215	215	275	275	234	248	219	227	248	248
5089	192772,991	8234531,266	227	235	184	184	228	242	157	157	305	305	215	215	277	277	224	244	219	227	244	244
5092	192770,787	8234535,666	227	235	184	184	230	242	157	157	307	307	215	215	275	275	232	242	219	227	240	246

ID	UTM		Vsq11		Vsq26		Vsq33		Vsq34		Vsq37		Vsq38		Vsq39		Vsq45		Vsq47		Vsq48	
5093	192767,558	8234536,729	227	241	186	186	210	236	159	159	307	307	215	215	275	279	226	226	217	225	244	244
5094	192767,558	8234536,729	227	235	186	186	210	236	157	157	305	305	215	215	275	275	222	228	225	225	244	244
5096	192762,247	8234533,333	245	249	184	214	228	240	159	159	307	307	211	215	279	279	226	246	227	227	248	248
5097	192761,191	8234532,211	227	227	184	214	234	240	159	159	305	305	211	211	277	277	240	248	225	225	242	242
5098	192760,119	8234532,196	225	253	182	212	210	240	159	167	307	307	221	221	277	277	226	232	227	227	224	246
5099	192761,176	8234533,318	227	227	184	184	234	242	157	157	307	307	213	221	275	275	234	246	225	225	224	242
5100	192762,277	8234531,119	243	243	184	184	242	242	161	175	307	307	215	221	265	277	244	244	225	225	244	244
5101	192758,972	8234537,718	227	243	186	186	212	230	157	167	305	305	217	221	273	277	236	240	225	225	246	246
5103	192748,213	8234540,893	243	247	182	212	228	240	167	167	307	307	217	221	NA	NA	232	248	227	227	242	242
5104	192741,876	8234534,160	245	247	184	184	210	228	157	157	307	307	215	215	277	277	232	232	227	227	244	244
6001	192510,531	8234137,794	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	307	307	213	213	NA	NA	236	242	225	225	NA	NA
6004	192554,424	8234140,615	227	247	NA	NA	230	230	157	157	NA	NA	NA	NA	NA	NA	248	254	NA	NA	NA	NA
6007	192543,757	8234137,145	235	247	186	186	228	228	155	155	305	305	NA	NA	275	281	240	240	225	225	NA	NA
6008	192545,946	8234133,852	227	247	182	194	234	234	171	171	305	305	205	213	275	283	246	246	225	225	236	236
6009	192545,961	8234132,745	NA	NA	184	206	NA	NA	NA	NA	305	305	205	215	NA	NA	NA	NA	225	225	224	224
6010	192542,762	8234131,593	NA	NA	NA	NA	228	234	155	167	NA	NA	NA	NA	NA	NA	248	254	NA	NA	224	224
6028	192467,556	8234146,062	223	227	NA	NA	228	240	171	175	NA	NA	NA	NA	273	273	226	240	215	225	NA	NA
6035	192447,018	8234159,069	241	245	NA	NA	228	228	NA	NA	NA	NA	213	213	NA	NA	224	230	NA	NA	NA	NA
6037	192465,123	8234167,072	243	243	NA	NA	228	228	157	173	301	301	206	217	275	275	236	242	225	225	NA	NA
6039	192484,193	8234182,840	NA	NA	184	196	228	228	NA	NA	NA	NA	206	219	NA	NA	NA	NA	225	225	NA	NA
6040	192458,497	8234181,378	219	241	180	190	228	228	167	167	NA	NA	206	206	NA	NA	230	236	215	223	NA	NA
6041	192460,209	8234134,885	231	235	NA	NA	228	240	159	159	303	303	206	215	275	279	236	248	223	223	NA	NA
6052	192509,032	8234168,785	235	241	180	186	238	238	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	230	248	NA	NA	NA	NA
6055	192501,441	8234175,325	219	241	184	188	226	226	157	157	NA	NA	NA	NA	NA	NA	242	248	NA	NA	NA	NA
6058	192483,672	8234142,962	229	247	186	186	228	228	159	159	303	303	NA	NA	NA	NA	232	236	215	223	NA	NA
6060	192489,700	8234094,313	229	247	180	184	230	230	159	159	301	301	213	213	NA	NA	232	236	215	223	NA	NA
6061	192489,715	8234093,206	229	247	NA	NA	230	230	159	167	301	301	205	213	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6063	192489,761	8234089,884	245	245	NA	NA	228	228	177	177	303	303	NA	NA	NA	NA	246	252	NA	NA	NA	NA

ID	UTM		Vsqr11		Vsqr26		Vsqr33		Vsqr34		Vsqr37		Vsqr38		Vsqr39		Vsqr45		Vsqr47		Vsqr48	
6064	192489,761	8234089,884	247	247	182	198	228	228	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	246	246	221	223	NA	NA
6066	192496,311	8234081,113	249	249	NA	NA	228	228	159	177	301	301	213	213	277	277	240	240	223	223	234	234
6067	192502,724	8234082,309	247	247	NA	NA	210	228	161	175	NA	NA	213	213	NA	NA	254	260	NA	NA	NA	NA
6068	192508,096	8234081,276	227	247	NA	NA	228	228	159	159	NA	NA	NA	NA	NA	NA	248	254	NA	NA	NA	NA
6070	192511,325	8234080,213	229	249	NA	NA	210	238	159	167	301	301	215	215	NA	NA	248	248	223	223	224	236
6073	192505,126	8234063,514	249	249	NA	NA	228	228	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	242	246	223	223	224	236
6074	192505,157	8234061,300	NA	NA	174	186	210	228	159	165	NA	NA	NA	NA	NA	NA	230	234	NA	NA	NA	NA
6075	192504,070	8234062,392	231	231	NA	NA	228	228	159	169	305	305	NA	NA	NA	NA	242	242	NA	NA	NA	NA
6084	192528,756	8234059,410	NA	NA	178	184	228	228	NA	NA	NA	NA	NA	NA	277	277	224	236	223	227	NA	NA
6096	192546,080	8234046,358	NA	NA	184	184	228	240	159	159	NA	NA	NA	NA	NA	NA	234	238	NA	NA	NA	NA
6101	192548,376	8234035,315	NA	NA	182	182	228	238	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	228	238	221	221	NA	NA