

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.

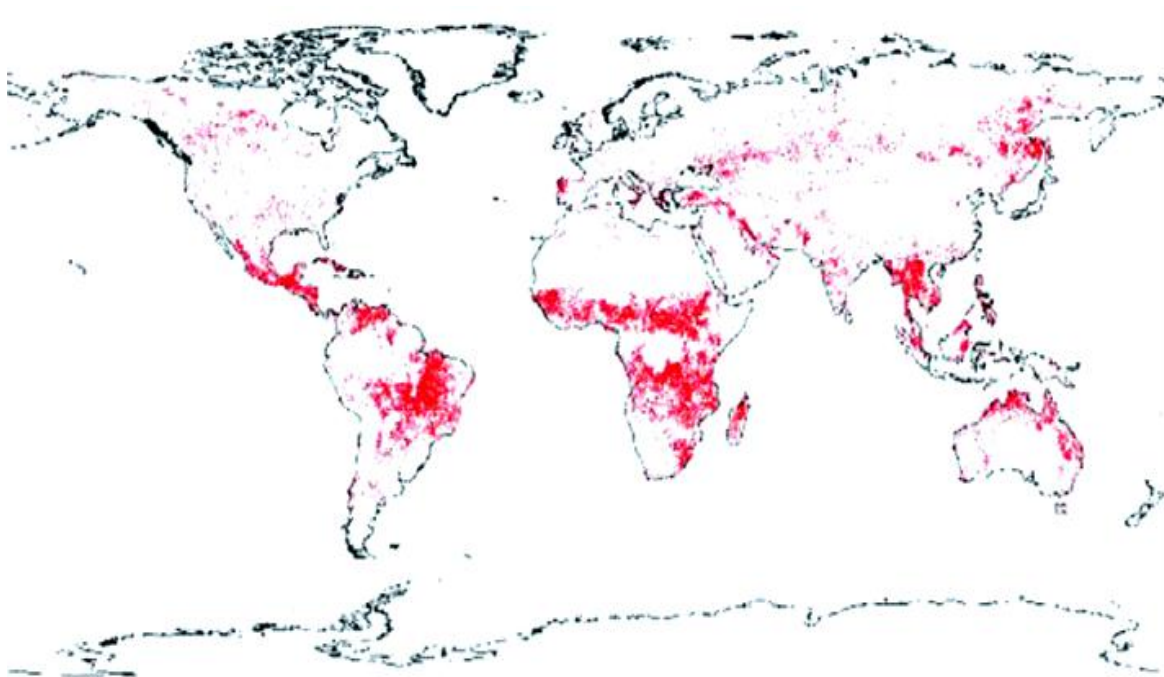


Figura 1: Mapa global da distribuição do fogo (Bond *et al.* 2005a). Em vermelho mais intenso corresponde às áreas de distribuição das plantas C₄, que coincide com a distribuição das savanas.

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 alógamo; apomítica ou apomixia e; apomítica parcial – alógama e assexuada (Hamrick 1982, Loveless & Hamrick 1984, Kearns & Inoué 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 subdivididas (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 microssatélites (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.

Microssatélites

Os microssatélites 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 microssatélite 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	ACACACACTTACACACAC	(AC) ₄ TT(AC) ₄
Tri	(ATT) _n	Composto	ATTATTATTACACACACAC	(ATT) ₃ (AC) ₅
Treta	(AACT) _n	Interrompido	ACACACTAGGCTACACAC	(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):

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

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

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

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

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.

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.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comunicação Social 21/05/2004. <<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. *Bioinformatics*. 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 – Ministério 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*, 38, 1358-1370.
- Whitlock, C., Higuera, P. E., McWethy, D. B., & Briles, C. E. (2010). Paleoeological 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*, 19, 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.