

**THANNYA NASCIMENTO SOARES**

**ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL E FLUXO GÊNICO**  
**EM *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE) NO CERRADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

**Prof. Dr. Lázaro José Chaves**

Coorientadora:

**Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles**

Goiânia, GO - Brasil

2009

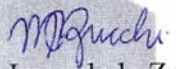
**THANNYA NASCIMENTO SOARES**


**TÍTULO: “Estrutura genética populacional e fluxo gênico em *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) no cerrado”.**


Tese DEFENDIDA e APROVADA em 22 de janeiro de 2009, pela Banca Examinadora Constituída pelos membros:

  
Prof. Fabrízio D'Aylala Valva  
ICB I/UFG

  
Prof. José Alexandre F. Diniz Filho  
ICB I/UFG

  
Dr.ª Maria Imaculada Zucchi  
I.A.C./Campinas, SP

  
Prof.ª Daniela de Melo e Silva  
U.C.G./Goiânia, GO

  
Prof. Lázaro José Chaves  
Orientador - EA/UFG

**UFG**

Goiânia - Goiás  
Brasil

Aos amigos do Laboratório de Genética &  
Biodiversidade, por todo apoio e  
incentivo.

*Ofereço*

Ao meu querido João Carlos Nabout, pelo  
amor, compreensão e companheirismo sem  
medida.

À minha família pelo carinho e confiança.

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente, gostaria de agradecer às instituições que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho. Ao programa nacional de excelência (PRONEX) do CNPq/SECTEC-GO (proc. 23234156), à Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa (PROPE) da Universidade Católica de Goiás pelo auxílio financeiro ao projeto e à empresa Naturae pelo auxílio financeiro. Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado e da taxa de bancada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFG, em especial à coordenadora do programa Dra. Mara Rúbia da Rocha e ao secretário Wellington Motta. A todos os professores que estão realmente envolvidos no crescimento e na boa qualidade da atividade acadêmico-científica do Programa, meu muito obrigada, pelo exemplo e dedicação.

Ao Laboratório de Biotecnologia da Embrapa/CNPAP, nas pessoas de Dra. Rosana P. V. Brondani, Dr. Cláudio Brondani e Dr. Tereza Cristina de O. Borba pela parceria e apoio no desenvolvimento dos iniciadores.

Aos membros da banca examinadora, Dra Maria Imaculada Zucchi, Dra Daniela de Melo e Silva, Dr. Jose Alexandre Felizola Diniz-Filho e Fabrizio D'Ayala Valva pela disponibilidade em participar da banca e pelas valiosas contribuições com este trabalho.

À minha co-orientadora, amiga e parceira de todas as horas Dra. Mariana Pires de Campos Telles por todo apoio e companheirismo durante toda minha vida acadêmica e pelas nossas conquistas durante todo este tempo. MUITO OBRIGADA! Este agradecimento se estende à toda sua família e em especial à suas filhas (Aninha e Belinha) pela compreensão quando você precisou ficar ausente em função deste e outros trabalhos que fizemos juntas... temos obrigação de proporcionar a elas bons momentos como pagamento. Também agradeço ao professor e amigo Dr. José Alexandre Diniz-Filho pelos grandes ensinamentos, conselhos e por fazer companhia pro João enquanto eu e Mariana tomamos uma cervejinha pra relaxar!

Ao meu orientador Dr. Lázaro José Chaves eu quero agradecer por tudo que me ensina, não só sobre a vida acadêmica e profissional, mas também como pessoa, pois é um exemplo de respeito e conduta com todos. Agradeço imensamente pelo critério nas correções e boas sugestões para o trabalho, mesmo com toda correria, e por cada momento de descontração durante nossas coletas!

A equipe de coleta foi composta, além do Prof. Lázaro, por muitos diferentes membros e agradeço à cada uma dessas pessoas que contribuíram para este trabalho. Em especial gostaria de agradecer aos professores Dr. Ronaldo Veloso Naves e Dr. Jorge Luiz do Nascimento e à colega Nara Fernandes Moura não só pelo apoio nas coletas em campo, mas também pelos ensinamentos e pelos momentos agradáveis que me propiciaram nas viagens.

Gostaria de agradecer imensamente à todos colegas e amigos do Laboratório de Genética & Biodiversidade pelo ajuda na coleta de dados moleculares e, especialmente, pelo apoio prestado na reta final do doutorado, que tudo ficou tão atropelado, e todos me ajudaram muito e torceram por mim. Em especial gostaria de agradecer à Lucileide Resende Vilela pela grande companheira de trabalho e amiga que é. À Juliana Rosa Ramos (Fofs) pelos bons momentos que passamos juntas e pela ajuda prestada sem medir esforços. À Talge Aiex Boni pelo apoio e incentivo, principalmente nesta reta final. Às queridas Eliane Cotrim Batista e Dayane Borges Melo pela grande ajuda na coleta dos dados moleculares.

Pela grande ajuda na edição, tradução dos abstracts e organização das referências da tese agradeço imensamente à Lucileide, Talge, André, Mariana e João. Nosso trabalho de formiguinhas foi muito importante para a conclusão deste documento no tempo necessário, muito obrigada!

Ao meu querido amor João Carlos Nabout, por tudo de bom que representa na minha vida, pelo incentivo, compreensão e carinho nos momentos difíceis que passei durante o doutorado. E por cada momento imensamente feliz que me proporciona dia após dia na minha vida pessoal, agradeço imensamente e espero retribuir tudo isso da melhor forma possível!

À minha família por todo carinho e confiança que tem por mim. Em especial, às minhas queridas mães vó Luzia e mãe Vera, meu pai, minhas irmãs e sobrinhos pelo amor e compreensão pelas minhas constantes ausências (física) em função do trabalho. À minha querida sogra Janeit Bitar pelo carinho, compreensão e por ter passado o réveillon fazendo tese junto comigo e o João. Eu amo muito todos vocês.

Este trabalho é o resultado do trabalho de muita gente importante pra mim. Minha avó Luzia me diz que sou muito abençoada pelas pessoas que tenho em minha vida. Eu acredito muito nisso e espero retribuir dando o melhor de mim para que estas pessoas sejam cada dia mais felizes. MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	8
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 O CERRADO.....	14
2.2 O BARUEIRO ( <i>Dipteryx alata</i> Vogel).....	17
2.2.1 Aspectos botânicos e evolutivos.....	17
2.2.2 Germinação e desenvolvimento inicial.....	21
2.2.3 Fenologia, ocorrência e distribuição natural.....	23
2.2.4 Utilidades.....	26
2.2.5 Estudos populacionais do barueiro: implicações para o uso e conservação.....	30
2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL.....	32
2.4 MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	36
<b>3 SEQUENCIAMENTO “SHOTGUN” PARA O DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM <i>Dipteryx alata</i> VOGEL</b>	
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	40
3.1 INTRODUÇÃO.....	41
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.4 CONCLUSÃO.....	47
<b>4 ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO VIA PÓLEN E SEMENTE ENTRE SUBPOPULAÇÕES DE <i>Dipteryx alata</i> VOGEL (FABACEAE)</b>	
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	48
4.1 INTRODUÇÃO.....	49
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.4 CONCLUSÕES.....	66
<b>5 ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E FLUXO GÊNICO INTRAPOPULACIONAL EM <i>Dipteryx alata</i> VOGEL (FABACEAE)</b>	
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	68
5.1 INTRODUÇÃO.....	69
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.4 CONCLUSÕES.....	80

<b>6</b>	<b>PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS DE <i>Dipteryx alata</i> VOGEL (FABACEAE) NO CERRADO: INFLUÊNCIA DOS EFEITOS HISTÓRICOS E CONTEMPORÂNEOS</b>	
	RESUMO.....	81
	ABSTRACT.....	82
6.1	INTRODUÇÃO.....	82
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
6.3	RESULTADOS.....	88
6.4	DISCUSSÃO.....	93
6.5	CONCLUSÃO.....	97
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
	APÊNDICE.....	118

## RESUMO GERAL

SOARES, T. N. **Estrutura genética populacional e fluxo gênico em *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) no Cerrado.** 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.<sup>1</sup>

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a estrutura genética e o padrão espacial do fluxo gênico intra e interpopulacional de *Dipteryx alata* Vogel, com base em marcadores microssatélites nucleares e cloroplastidiais. Foi utilizada uma estratégia de desenvolvimento de iniciadores que se baseia no seqüenciamento aleatório de fragmentos provenientes de uma biblioteca genômica “shotgun” para a detecção de regiões microssatélites, em barueiro. Das 668 seqüências obtidas, foram encontradas 12 regiões microssatélites que possibilitaram a construção dos pares de iniciadores. Estas regiões são compostas por motivos com dois a seis nucleotídeos, que variam entre 136 a 380 pb. Isto mostra que a estratégia de seqüenciamento aleatório a partir de bibliotecas “shotgun” é interessante por possibilitar a obtenção de iniciadores para regiões repetitivas com diferentes motivos. Dois destes locos (Da\_E06 e Da\_E12) foram polimórficos, apresentando três alelos cada. As estimativas de  $H_e$  para estes locos apresentaram valores satisfatórios, considerando o número de alelos, e foram iguais a 0,2946 e 0,2879, respectivamente. Isto indica que os iniciadores desenvolvidos e padronizados com sucesso neste trabalho podem ser utilizados para estudos genético-populacionais. Juntamente com estes dois iniciadores desenvolvidos, foi utilizado outro transferido da espécie *Phaseolus vulgaris* (BM164) para *D. alata*, além de outros dois iniciadores microssatélites cloroplastidiais para análises moleculares de 23 subpopulações georeferenciadas, totalizando 775 plantas, distribuídas ao longo da área de ocorrência natural do Cerrado. Destas plantas, 210 foram coletadas e georeferenciadas uma a uma, ao longo das margens do alto rio Araguaia nos estados de Mato-Grosso (RAMT) e Goiás (RAGO), para análises de distribuição espacial da variabilidade genética em escala local. Para testar a hipótese de que a variabilidade genética das subpopulações de *D. alata* se distribui conforme o modelo central-periférico, foram avaliadas as relações entre as estimativas de parâmetro genético de diversidade com os padrões de distribuição potencial da espécie. Foi observado que as subpopulações de *D. alata* apresentam consideráveis níveis de variabilidade genética que

---

<sup>1</sup> Orientador: Prof. Dr. Lázaro José Chaves. EA-UFG.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mariana Pires de Campos Telles. ICB-UFG.



se encontra significativamente estruturada entre as subpopulações, tanto para os dados nucleares quanto para os cloroplastidiais, apresentando-se também estruturada no espaço. A estimativa da taxa de fecundação cruzada aparente ( $t_a = 1,0575$ ) indica que a espécie seja alógama. As estimativas das razões de migração via pólen e via semente foram menores do que 1, o que indica que a dispersão de sementes contribui mais efetivamente para o fluxo gênico total em escala regional. As estimativas dos parâmetros genéticos de diversidade referentes à população contígua ao Rio Araguaia mostraram valores semelhantes entre as margens do rio. A estimativa da taxa de fecundação cruzada aparente (0,9434) confirma a reprodução por alogamia no barueiro. O baixo nível de diferenciação entre as subpopulações das duas margens do rio indica que o rio Araguaia não confere uma barreira física efetiva ao fluxo gênico. O tamanho efetivo de vizinhança, ou seja, o número médio de indivíduos numa área onde ocorre panmixia, para os dados nucleares e cloroplastidiais foi igual a 85,64 e 22,99, respectivamente, indicando que a dispersão de sementes é mais restrita em escala local. O correlograma gerado a partir dos dados cloroplastidiais apresenta um padrão clinal de variação mais evidente do que o proveniente dos dados nucleares, o que sugere que a presença da estrutura genética espacial deve estar sendo mais influenciada pelo padrão de dispersão da semente. Foi observado que parâmetros genéticos estimados para *D. alata* não se enquadram no clássico modelo central-periférico, pois as populações tidas como periféricas (de acordo com a distribuição geográfica dos pontos de coleta) tendem a exibir maiores valores para estas estimativas, com destaque para as subpopulações das bordas Sul e Oeste do bioma. A relação encontrada entre os valores estimados para o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ) com o impacto humano indica que as subpopulações estudadas podem estar sofrendo as conseqüências dos processos de fragmentação e uso da terra na variabilidade genética, causado provavelmente pelo recente processo de ocupação do Cerrado.

*Palavras-chave:* baru, cpDNA, desenvolvimento de iniciador, estrutura genética espacial, microssatélite.

## GENERAL ABSTRACT

SOARES, T. N. **Populational genetic structure and gene flow in *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) from Brazilian Cerrado.** 2009. 120 f. Thesis (Doctorate in Agronomy: Genetics and Plant Breeding) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.<sup>2</sup>

The goal of this study was to evaluate the genetic structure and the spatial pattern of intra and interpopulational gene flow of *Dipteryx alata* Vogel, based on nuclear and chloroplastidial microsatellite markers. Primers were developed based on sequencing of random fragments from a shotgun genomic library for detection of microsatellite regions. 12 microsatellites regions were obtained from 688 sequences, which allowed the construction of pairs of primers. These regions are composed of motifs with two to six nucleotides, ranging from 136 to 380 base pairs. This shows that the random sequencing strategy from shotgun libraries is interesting because it allows the achievement of primers for repetitive regions with different motifs. Two of these loci (Da\_E06 e Da\_E12) were polymorphic with three alleles each.  $H_e$  estimation for these loci showed satisfactory values (0.2946 and 0.2879, respectively), considering the number of alleles. Also, we used a transferred primer from the species *Phaseolus vulgaris* (BM164) for *D. alata*. Moreover, other two chloroplastidials microsatellite primers were used for molecular analyses of georeferenced subpopulations, totalizing 775 plants distributed over the natural occurrence area of Cerrado. 210 of these plants were collected and georeferenced one by one along the margins of the Araguaia River in the states of Mato-Grosso (RAMT) and Goiás (RAGO) for spatial distribution of genetic variability in local scale analysis. The relationship between estimations of genetic diversity parameters with patterns of potential distribution of species was evaluated. This was used to test the hypothesis that the genetic variability of *D. alata* populations is distributed according to the central-periphery model. *D. alata* subpopulations showed considerable high levels of genetic variability that was significantly structured among subpopulations and well structured in space, both for nuclear and chloroplastidial data. The estimation of the apparent cross-fertilization rate ( $t_a = 1.0575$ ) indicates that the species is allogamous. Estimations of migration rates by pollen and by seeds were lower than one, indicating that seed dispersal contributes more

---

<sup>2</sup> Adviser: Prof. Dr. Lázaro José Chaves. EA-UFG.

Co-adviser: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mariana Pires de Campos Telles. ICB-UCG.

effectively for total gene flow. Estimates of the genetic diversity parameters from the Araguaia River population showed similar values between both margins. The estimation of the apparent cross-fertilization rate (0.9434) indicated that the Araguaia River is not a physical barrier to effective gene flow. The effective size of the neighborhood, i.e., the mean number of individuals in an area where panmixia occurs was 85.64 and 22.99 for nuclear and chloroplastidial data, respectively, indicating that seed dispersal is more restricted. The correlogram generated with chloroplastidial data presented a cline pattern of variance more evident than with nuclear data, suggesting that the presence of spatial genetic structure is being more influenced by seed dispersal. We observed that the genetic parameters do not follow a classical central-periphery model, because peripheral population (according to geographical distribution of sampling locations) tended to demonstrate higher values for these estimations, mainly the South and Western subpopulations. The relationship found between the fixation index ( $f$ ) with human impact indicated that the subpopulations evaluated can be affected by fragmentation process and land use, probably caused by the recent human colonization in Cerrado biome.

*Key words:* “baru” tree, cpDNA, primer development, spatial genetic structure, microsatellite.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Um dos principais desafios para a conservação do Cerrado é demonstrar a importância que a biodiversidade desempenha no funcionamento dos ecossistemas e isso ocorre em função da escassez de conhecimento quanto às implicações das alterações e tipos de uso da terra sobre as espécies do bioma (Klink & Machado, 2005). A flora do Cerrado é muito rica, provavelmente em função da extensão do bioma e da grande quantidade de especiações ocorridas durante os períodos glaciais e interglaciais do Quaternário, bem como da sua enorme variedade de paisagens e tipos fisionômicos (Mendonça et al., 1998; Behling & Hooghiemstra, 2001; Oliveira-Filho & Ratter, 2002). No entanto, o conhecimento sobre a biodiversidade florística e a biologia destas espécies é ainda muito incipiente no Cerrado, o que dificulta o estabelecimento de estratégias eficientes para a sua conservação. (Mendonça et al., 1998; Oliveira-Filho & Ratter, 2002).

O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a atuação dos processos microevolutivos e, portanto, para a evolução de todas as espécies (Solé-Cava, 2001). Os estudos genético populacionais estão diretamente relacionados ao entendimento do componente genético da diversidade biológica e indiretamente à variabilidade ecológica, sendo importantes para o delineamento de ações que assegurem o potencial evolutivo das espécies (Frankham et al., 2008).

A espécie *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) é uma planta que possui uma ampla distribuição no Cerrado Brasileiro. Ocorre principalmente em locais com solos mais drenados, apresentando distribuição irregular na paisagem, podendo formar grandes agrupamentos. O barueiro apresenta grande importância ecológica para o bioma, sendo classificado como espécie chave do Cerrado por ser uma das poucas árvores que amadurece o fruto na estação seca e alimenta várias espécies da fauna (mamíferos, aves, insetos), em uma época de escassez de alimentos na região (Sano et al., 2004). Além disto, *D. alata* faz parte do grupo de espécies nativas usadas pela população regional como fonte complementar de renda familiar. Em um levantamento realizado por Almeida et al. (1998),

entre 110 espécies do Cerrado, o barueiro foi uma das que apresentou mais possibilidade de uso: alimentício, forrageiro, madeireiro, medicinal, melífero, ornamental, oleaginoso e tanífero. É uma das espécies frutíferas nativas mais promissoras para cultivo, em razão do seu uso múltiplo, alta taxa de germinação de sementes e de estabelecimento de mudas. Em longo prazo, o uso do barueiro em áreas a serem recuperadas, como reservas legais e de proteção ambiental, margens de rios e córregos, favorecerá a sua conservação e a manutenção de outras espécies associadas ou usadas como alimento (Sano et al., 2004).

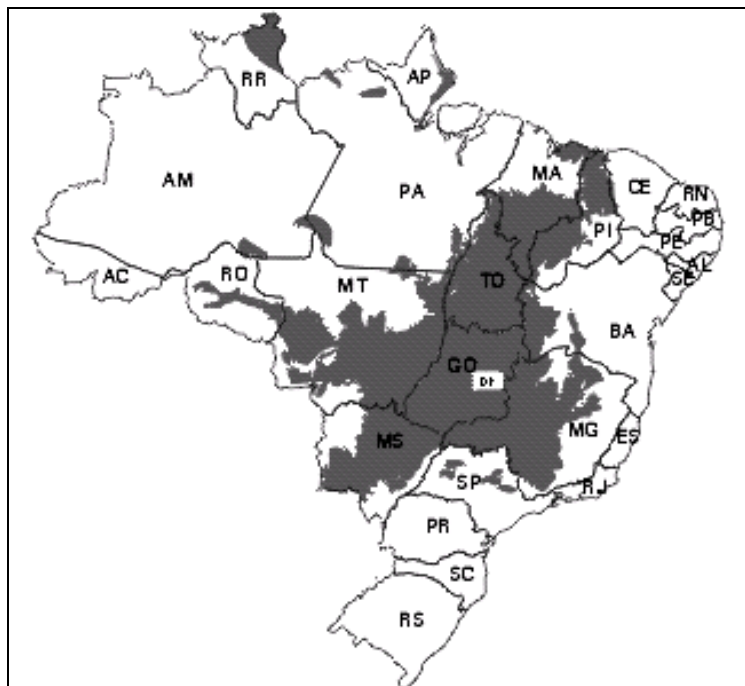
O objetivo geral deste estudo foi avaliar a estrutura genética e o padrão espacial do fluxo gênico intra e interpopulacional de *D. alata*, com base em marcadores microssatélites genômicos e cloroplastidiais. Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver iniciadores microssatélites genômicos para *D. alata*;
- Avaliar o sistema reprodutivo a partir da estimativa da taxa aparente de fecundação cruzada;
- Estimar a variabilidade genética entre e dentro de subpopulações e verificar a estruturação espacial desta variabilidade, com base em marcadores microssatélites genômicos e cloroplastidiais;
- Estimar o fluxo gênico entre as subpopulações e entre as plantas dentro de subpopulações, levando-se em conta a contribuição relativa do pólen e da semente;
- Avaliar os padrões de distribuição da variabilidade genética em subpopulações “centrais” e “periféricas” de *D. alata* no Cerrado brasileiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

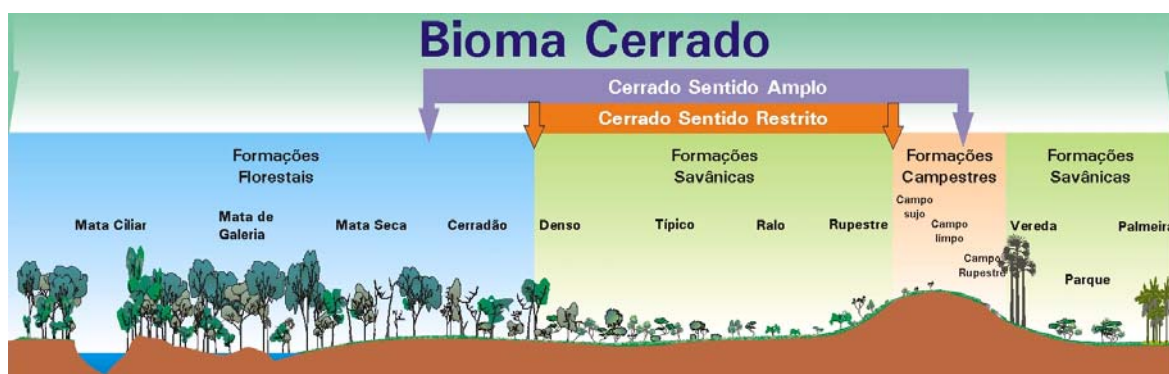
### 2.1 O CERRADO

O bioma Cerrado é o segundo maior do país em extensão, perdendo apenas para a Floresta Amazônica. Possui uma área de aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados, o que corresponde a cerca de 20% do território brasileiro e pequenas áreas do leste da Bolívia e do noroeste do Paraguai. No Brasil a distribuição do bioma é coincidente com a região central do país (Figura 2.1), com sua área contínua abrangendo os Estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo. Em áreas disjuntas ocorre ao norte nos Estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul, em pequenas manchas no Paraná.



**Figura 2.1.** Distribuição geográfica do bioma Cerrado no Brasil (Embrapa, 2005).

O termo Cerrado (do espanhol meio fechado, fechado ou denso) surgiu como um adjetivo para caracterizar um tipo de ambiente de terras fracas para a agricultura e com vegetação arbórea mais densa, os campos cerrados. Atualmente o termo é empregado em sentido mais amplo para designar uma grande variedade de fitofisionomias, confundindo-se, às vezes, com uma região geográfica. Atualmente, são descritos onze tipos fisionômicos gerais, enquadrados em formações florestais (mata ciliar, mata de galeria, mata seca e cerradão), savânicas (cerrado senso estrito, parque de cerrado, palmeiral e vereda) e campestres (campo sujo, campo rupestre e campo limpo), muito dos quais apresentam subtipos (Ribeiro & Walter, 1998). Um esquema adaptado dessas onze fitofisionomias está ilustrado na Figura 2.2, na qual as fitofisionomias estão apresentadas em um gradiente daquelas de maior biomassa (formações florestais à esquerda) para as de menor biomassa (formações savânicas e campestres à direita) e na posição topográfica em que geralmente ocorrem, não implicando que cada uma dessas fitofisionomias ocorra na natureza uma ao lado da outra (Ribeiro & Walter, 2001).



**Figura 2.2.** Esquema adaptado das principais fitofisionomias do bioma Cerrado, segundo Ribeiro & Walter (1998) (Ribeiro & Walter, 2001).

O bioma Cerrado teve cerca da metade dos 2 milhões de km<sup>2</sup> originais transformados em pastagens cultivadas, culturas anuais e diversos outros tipos de uso. As transformações ocorridas trouxeram danos ambientais diversos, tais como a fragmentação de habitats, extinção de parte da biodiversidade, invasão de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos, degradação de ecossistemas, alterações nos regimes de queimadas, desequilíbrios no ciclo do carbono e possivelmente modificações climáticas regionais (Machado et al., 2004; Klink & Machado, 2005). Tais características, juntamente

com a riqueza de espécies endêmicas, especialmente da flora, fizeram com que o Cerrado fosse considerado um dos *hotspots* mundiais prioritários para a conservação (Myers et al., 2000). Um dos principais desafios para a conservação do Cerrado é demonstrar a importância que a biodiversidade desempenha no funcionamento dos ecossistemas, isso ocorre em função da escassez de conhecimento sobre a biodiversidade e das implicações das alterações e tipos de uso da terra sobre o bioma (Klink & Machado, 2005).

Estima-se que haja exista uma grande riqueza de espécies vegetais no Cerrado, que estaria relacionada, principalmente, à extensão do bioma e à grande quantidade de especiações ocorridas durante os períodos glaciais e interglaciais do Quaternário, além da sua enorme variedade de paisagens (Mendonça et al., 1998; Oliveira-Filho & Ratter, 2002). Muitos fatores podem afetar a distribuição das espécies de plantas no Cerrado, como o clima, fertilidade e pH do solo, disponibilidade de água, geomorfologia e topografia, latitude, frequência de fogo e fatores antrópicos, além da interação complexa entre estes fatores (Oliveira-Filho & Ratter, 2002). O número total de espécies é ainda muito impreciso, mas um levantamento recente listou 12.356 espécies da flora vascular nativa do Cerrado (Mendonça et al., 2008). Esta riqueza quase dobrou o número de espécies estimado anteriormente (Mendonça et al., 1998).

A flora do Cerrado é composta por plantas que apresentam os mais diversos usos, dentre os quais se destacam o medicinal, ornamental, madeireiro, industrial e alimentício. Isto que faz com que a exploração comercial destas plantas componha uma alternativa de complementação de renda para a população da região. O potencial mais explorado do Cerrado é o seu aproveitamento alimentar, no qual as frutíferas são consumidas naturalmente ou na forma de sucos, licores, geleias e pratos salgados (Almeida, 1998; Almeida et al., 2008).

Ribeiro & Silva (1996) discutem que a principal limitação para o melhor uso das espécies de potencial econômico do Cerrado é a ausência de informações básicas sobre sua biologia e utilização agrônômica e florestal. Estas informações estão diretamente relacionadas às estratégias de estabelecimento destas espécies em suas áreas de ocorrência e são importantes para a formação de mudas em viveiro, visando sua conservação e domesticação. Melo et al. (2008) reuniram informações sobre a coleta, propagação e desenvolvimento inicial de plantas do Cerrado com a finalidade de contribuir com os estudos que visem a conservação e/ou uso destas espécies.



Tanto para fins de conservação, como para domesticação e melhoramento, o conhecimento da variabilidade genética natural de uma espécie nativa que apresenta potencial de utilização é de suma importância. Para a conservação esse conhecimento permite avaliar áreas que apresentam maior diversidade possibilitando a classificação de pontos prioritários com o menor número de subpopulações que maximiza o esforço de conservação. Parâmetros de diversidade entre subpopulações constituem informação importante para determinação de tamanhos efetivos populacionais e do número de subpopulações a ser considerado em um programa de conservação, tanto *in situ*, quanto *ex situ*. Tais parâmetros fornecem, ainda, informações básicas para o início do uso em maior escala e planejamento de estratégias de melhoramento destas espécies pela exploração, via seleção, da variabilidade natural. No entanto, ainda há muitas espécies com amplo potencial de utilização que ainda carecem de estudos desta área. O barueiro e a mangabeira, por exemplo, são espécies para as quais a crescente demanda de exploração, tornam os estudos genético populacionais imprescindíveis (Soares et al., 2008c).

## 2.2 O BARUEIRO (*Dipteryx alata* Vogel)

### 2.2.1 Aspectos botânicos e evolutivos

*Dipteryx alata* Vogel pertence ao reino Plantae, subreino Tracheobionta, subdivisão Spermatophyta, divisão Magnoliophyta (Angiospermas), classe Magnoliopsida (dicotiledôneas), subclasse Rosidae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Dipterygeae, gênero *Dipteryx* Schreber.

A família Fabaceae (J. Lindley) possui 686 gêneros e aproximadamente, 18.000 espécies descritas sendo, portanto, uma das maiores entre as leguminosas, perdendo apenas para as famílias Asteraceae e Orchidaceae. Em termos de importância econômica as Fabaceae têm apenas as Poaceae como rivais, em função da sua grande importância na agricultura (Kirkbride Jr et al., 2003). Todos os legumes comuns à nossa dieta pertencem à família Fabaceae, tais como o feijão, amendoim, grão-de-bico, ervilha, soja etc. Uma característica comum a todos é a riqueza de proteínas, óleos ou carboidratos.

O gênero *Dipteryx* é um importante representante da família Fabaceae. Foi sugerido por Schreb. como resultado da junção de dois outros gêneros, o *Taralea* e

*Coumarouna*, ambos de Aublet. Contém 25 espécies, sendo que 15 delas ocorrem no Brasil (Torres, 2001).

A espécie *D. alata* (barueiro) foi originalmente descrita por Vogel em 1837. É a única do seu gênero que ocorre no Cerrado, enquanto as outras ocorrem principalmente em matas da Floresta Amazônica (Ribeiro et al., 2000). Em função disso, Rizzini (1963) propõe que *D. alata* provavelmente é uma espécie vicariante de *Dipteryx odorata* (Aubl) Willd (cumaru). Segundo o autor, a grande plasticidade da forma dos folíolos de *D. alata*, em relação a diferentes regimes de luz, é uma adaptação de uma espécie originalmente da mata para ambientes mais abertos.

O estudo citogenético (morfológico e evolutivo) de *D. alata* mostra que a espécie possui o número cromossômico  $2n = 16$ , metade da quantidade de *D. odorata* ( $2n = 32$ ), indicando que o barueiro é uma espécie diplóide e o cumaru poliplóide. Uma das explicações plausíveis para a relação evolutiva entre as duas espécies é a de que o cumaru tenha derivado do barueiro por poliploidização. Entretanto, essa afirmativa vai de encontro com a versão de Rizzini (1963) e, além disso, as razões ecológicas indicam que é mais provável que as espécies derivem da floresta para o Cerrado e não ao contrário (Torres, 2001).

*D. alata* é uma árvore que possui tronco reto com casca pouco sulcada e porte elevado, chegando até 15 m de altura e 15 cm a 40 cm de diâmetro à altura do peito (DAP) (Figura 2.3). O nome popular mais amplamente conhecido para a espécie é baru, entretanto, possui vários outros como, fruta-de-macaco, castanha-de-burro, cumaru, cumbaru, barujó, castanha-de-ferro, coco-feijão, cumaru-da-folha-grande, cumarurana, cumaru-verdadeiro, cumaru-roxo, cumbaru, emburena-brava, feijão-coco, meripagé, pau-cumaru (Ribeiro et al., 2000).

O barueiro possui folhas alternas, compostas pinadas, imparipinadas, pecioladas, sem estípulas e possui ráquis alada (Almeida et al., 1998). As folhas das plantas expostas ao sol são maiores que as de sombra, e seus folíolos são obtusos, diferentemente das plantas sombreadas que são acuminados (Melhem, 1975b). A inflorescência é uma panícula terminal, nas axilas das folhas superiores com cerca de 200 a 1000 flores, que são branco-rosadas (Figura 2.4), com aproximadamente 8 mm de comprimento. As flores possuem dez estames subiguais, monadelfos, as anteras são rimosas, ovais, o ovário é súpero com um só óvulo parietal inserido próximo ao ápice (Almeida et al., 1998).



**Figura 2.3.** Aspecto geral do barueiro (*Dipteryx alata*). Foto: Thannya Nascimento Soares, Natividade – TO, outubro de 2008.



**Figura 2.4.** Flor de barueiro (*Dipteryx alata*). Foto: Lázaro José Chaves, Arraias – TO outubro de 2008.

O fruto é um legume drupáceo, indeiscente (permanece fechado na maturidade), com cerca de 4 cm a 5 cm de comprimento, possui cor marrom-claro (castanho) opaco, com forma ovóide e cálice persistente (Figura 2.5). A composição anatômica do fruto do barueiro é a seguinte: o pericarpo em secção transversal exhibe as seguintes camadas: 1<sup>a</sup>) **epicarpo** – camada externa, de consistência coriácea e cor marrom-clara; 2<sup>a</sup>) **mesocarpo** – camada intermediária, relativamente delgada, com consistência farinácea; 3<sup>a</sup>) **endocarpo** – espessa, com cerca de 8 mm, formada por feixes de fibras

lignificadas, é extremamente duro e resistente, o que dificulta muito a extração da semente (Melhem, 1974a; Ferreira et al., 1998).



**Figura 2.5.** Diferentes ilustrações de frutos de barueiro (*Dipteryx alata*).

A semente é única por fruto, que fica totalmente solta no interior do endocarpo. Sua cor é marrom-clara, quando nova, enegrecendo quando madura, elipsóide, brilhante, com cerca de 2 cm a 2,5 cm (Figura 2.6). São do tipo exalbuminosas, com embrião grande, retilíneo, ficando as substâncias de reserva nos cotilédones grandes e carnosos (Melhem, 1974a; Almeida et al., 1998).



**Figura 2.6.** Fruto de barueiro (*Dipteryx alata*) mostrando a semente solta no seu interior.

A forma da semente de *D. alata* proporciona uma extensa área de contato entre a testa e o substrato úmido. Embora nas leguminosas predominem espécies de sementes impermeáveis, a testa e não o hilo e a microfila desta espécie permite a permeabilidade da semente (Melhem, 1974b). As características da semente de baixas taxas médias de umidade (aproximadamente entre 6% e 9%) e permeabilidade sugerem que ela pode ser classificada como ortodoxa, com tegumento permeável (Botezelli et al., 2000). O fato de ela ser ortodoxa é muito interessante para a conservação *ex situ*, uma vez que estas sementes suportam melhor longos períodos de armazenamento. Entretanto, é necessário que se façam estudos sobre a resistência das sementes às condições de armazenamento *ex situ*, de baixa temperatura e umidade.

### 2.2.2 Germinação e desenvolvimento inicial

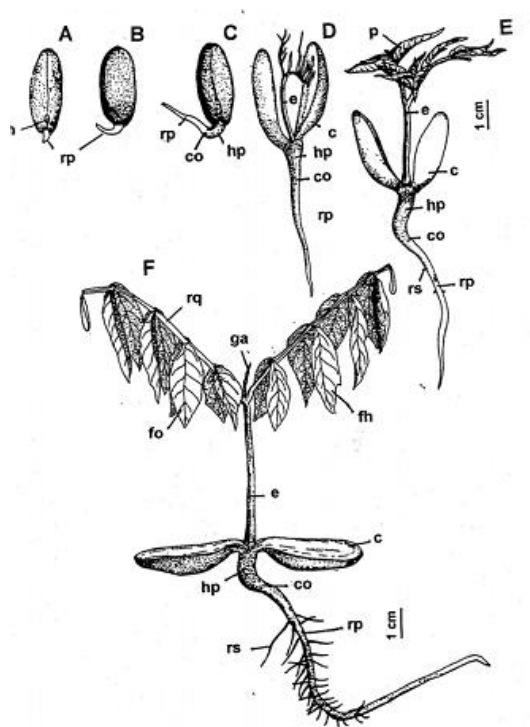
A longevidade das sementes de barueiro está compreendida entre três e quatro anos, e pode ser relacionada com um conteúdo de água relativamente baixo e, possivelmente, com redução da atividade metabólica. No quarto ano a taxa de germinação diminui em cerca de 90%, logo a taxa de germinação não ultrapassa os 10% (Melhem, 1975a).

Em condições naturais, a semente do barueiro germina no interior do fruto, sendo que sua germinação pode ser influenciada pela iluminação (Melhem, 1974b; 1975a). As condições de temperatura não influenciam na germinação da semente, entretanto a luminosidade parece influenciar positivamente, uma vez que ela parece inibir a ação de fungos patogênicos (Melhem, 1975a; Ribeiro et al., 2000).

Em condições experimentais verificou-se que a germinação dentro do fruto ocorre em cerca de 40 a 60 dias, entretanto, quando a semente é isolada, germina em 13 a 20 dias (Ribeiro et al., 2000), com uma taxa de germinação que pode atingir 95%. (Ferreira et al., 1998).

A germinação ocorre da maneira descrita a seguir. A partir de cinco dias após a semeadura, ocorre a protrusão da raiz primária (Figura 2.7: A), rompendo o tegumento na base da semente, abaixo da região hilar. À medida que ocorre o seu alongamento (Figura 2.7: B-E), apresenta-se com a base mais escura e mais espessa, com afinamento crescente em direção ao ápice e apresentando coifa amarelada. Surgem os pelos simples, esparsados,

de base alargada, podendo ter mais de um pêlo na mesma base, translúcidos, de tamanhos diferentes, somente vistos sob microscópio estereoscópico; a raiz primária adquire cor ferrugínea até aproximadamente a metade de seu comprimento e o ápice é amarelado com coifa amarela. Hipocótilo (Figura 2.7: C-E) é curto, cilíndrico, herbáceo, com leve achatamento nos lados, na região próxima à inserção dos cotilédones. Cotilédones (Figura 2.7: D-E), quando ocorre o rompimento dos tegumentos, são inicialmente semi-abertos; apresentam uma depressão imersa deixada pelo eixo-embrionário na superfície ventral; quando totalmente abertos e completamente livres do tegumento são opostos. Epicótilo (Figura 2.7: D-E) é longo, verde-claro, glabro, com pontuações arredondadas e, quando visto em seção transversal, é elíptico. Protófilos compostos, opostos, paripinados com três a quatro pares de folíolos, ráquis levemente aladas e com expansão laminar no ápice (Figura 2.7: E). Folíolos inicialmente enrolados dorsalmente, com forma aciculada, verde-claros, ápice acuminado, base obtusa, bordo inteiro, nervação peninérvea, sendo a nervura principal impressa na face dorsal e as secundárias e terciárias vestigiais, consistência membranácea, glabros, com peciólulo curto (Figura 2.7: D-E). Apresentam alguns folíolos heterófilos. Germinação é epígea fanerocotiledonar (Ferreira et al., 1998).



**Figura 2.7.** Etapas da germinação e do crescimento inicial de *Dipteryx alata* Vogel (A-E - germinação; F - plântula). Fonte: Ferreira, et al. (1998). Legenda: c-cotilédone; co-coleto; e-epicótilo; fh-folíolo heterófilo; fo-folíolo; ga-gema apical; h-hilo; hp-hipocótilo; p-protófilo; rp-raiz primária; rq-raque; rs-raiz secundária.

A plântula (Figura 2.7: F) apresenta raiz primária axial, pivotante longa, fina, sinuosa, cilíndrica, de cor ferrugínea até próximo ao ápice e amarelada no ápice e coifa, apresentando primórdios de raízes secundárias que se formam posteriormente e se apresentam finas, curtas e de cor amarelada, verificando-se também a presença de pelos. Nesta fase, verifica-se a presença de descamações em forma de tiras na epiderme da raiz, no sentido longitudinal, expondo uma superfície glabra (Ferreira et al., 1998).

Ferreira et al. (1998) observaram ainda, uma estagnação no crescimento das mudas, no período de junho a setembro de 1996. Ao final do estudo, aos 12 meses, as mudas alcançaram altura média de 21 cm e diâmetro médio de 6,9 mm. Nesta fase observou-se um maior desenvolvimento da raiz primária, constituindo-se uma provável estratégia de estabelecimento da espécie em condições naturais, o que é comum para a maioria das espécies do Cerrado, que fixam rapidamente as suas raízes no solo para atingirem as camadas mais úmidas. De fato, no desenvolvimento da plântula do barueiro o sistema radicular possui um rápido crescimento, chegando a ter duas ou três vezes a altura da planta. Desenvolve uma raiz principal, que cresce verticalmente em direção à profundidade, emitindo poucas raízes secundárias, curtas. O desenvolvimento da planta é altamente influenciado pela intensidade de luz recebida, podendo apresentar diferenças morfológicas, como formato de folha, em função disso (Melhem, 1975b).

### **2.2.3 Fenologia, ocorrência e distribuição natural**

*D. alata* é uma árvore perenifólia a levemente caducifólia (classificada como semidescídua), a renovação das folhas é tardia na seca e a floração e a frutificação ocorrem durante a estação chuvosa, seguidas pela dispersão dos diásporos na estação seca subsequente (Lorenzi, 1992; Bulhão & Figueiredo, 2002). No período da seca a planta é facilmente identificada pela cor marrom-dourada característica da sua copa nesta época e algumas plantas com copa com poucas folhas (Figura 2.8). A espécie pode ser classificada como sempre verde tardia por possuir certa resistência a deficiência hídrica conferida por uma combinação de raízes mais profundas, maior massa foliar por área, escleromorfismo e maior capacidade de transporte de água no xilema (Bulhão & Figueiredo, 2002)

A floração ocorre de novembro a fevereiro, excepcionalmente em outras épocas e o período de formação dos frutos ocorre a partir de janeiro, produzindo grande quantidade de frutos que podem ser encontrados de julho até outubro, dependendo da

localidade, quando a árvore se encontra praticamente sem folhas a espécie é classificada como descídua (Ribeiro et al., 2000). Ocasionalmente, a floração pode ser reduzida, o que provoca uma baixa frutificação também, essa limitação na produção de flores pode ser consequência de uma possível deficiência hídrica nos solos submetidos a uma seca mais rigorosa (Bulhão & Figueiredo, 2002).



**Figura 2.8.** Aspecto geral do barueiro (*Dipteryx alata*) no período de seca. Foto: Lázaro José Chaves, Cocalinho – MT, setembro de 2004.

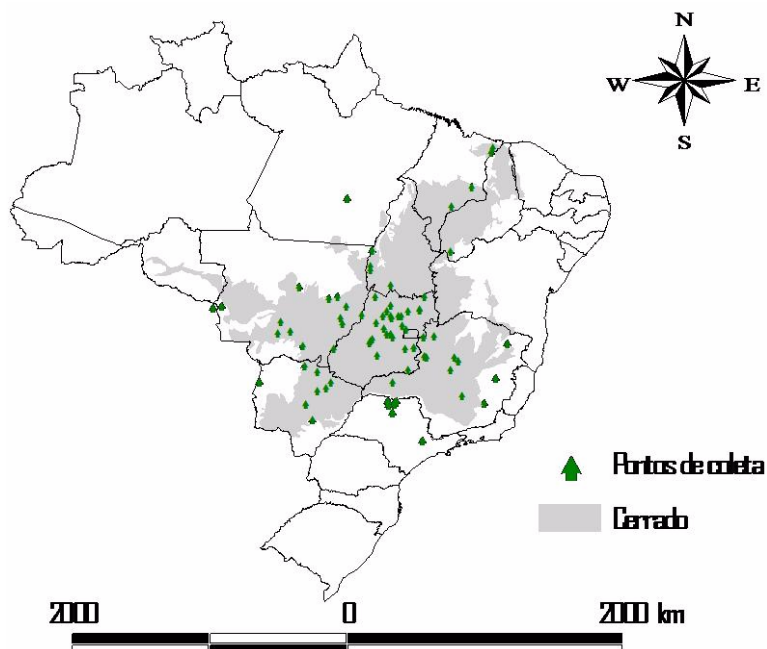
O barueiro é hermafrodita, heliófila, que apresenta dispersão zoocórica e barocórica (Ribeiro et al., 2000). Esta última forma de dispersão é típica de plantas que possuem frutos pesados que normalmente caem junto da planta-mãe e às vezes ali conseguem se reproduzir (Ferreira & Cunha, 1980). Já a dispersão zoocórica é realizada principalmente por morcegos, macacos e o gado, nas regiões de pastagem. Entretanto, alguns autores relatam que os macacos podem atrapalhar a dispersão uma vez que eles conseguem quebrar o fruto para comer a semente (Ribeiro et al., 2000).

Quanto à polinização do barueiro, Peres Filho & Dorval (1995) observaram insetos visitantes de flores pertencentes às Ordens Diptera, Hymenoptera e Lepidóptera, indicando que estes sejam responsáveis pela polinização da espécie.



Apesar da espécie *D. alata* ter distribuição irregular, às vezes pode formar grandes agrupamentos. Ocorre em toda área contínua do Cerrado, principalmente nos Cerradões e na Matas Secas, e eventualmente no Cerrado sentido restrito. Ribeiro et al. (2000) citam que em um trabalho de levantamento de espécies lenhosas no Cerrado senso estrito em 316 localidades o barueiro foi encontrado 86 vezes. O limite de ocorrência pode estar associado às condições de maior fertilidade do solo (solos mesotróficos) (Almeida et al., 1998). Distribui-se nos Estados do Amazonas, Maranhão, Bahia, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e no Distrito Federal. Além do Brasil, o Barueiro também pode ser encontrado em alguns países vizinhos como o Paraguai (Ribeiro et al., 2000).

Em um levantamento realizado na rede speciesLink (<http://splink.cria.org.br>) sobre bases de dados que informam pontos de coletas de barueiro foram encontrados cadastros de coletas em sete bancos de dados que totalizaram 74 pontos de coleta, para os quais havia dados de georeferência. Esses dados foram reunidos com os de dados de outras dezoito coletas realizadas por pesquisadores da Universidade Federal de Goiás para construir um mapa de localidades de coleta de barueiro no Brasil, utilizando o programa ArcView (ESRI - Environmental Systems Research Institute, 2000) (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Mapa de distribuição de *Dipteryx alata* no Cerrado, construído com base nas coordenadas geográficas de pontos de coleta de 7 bases de dados cadastradas no site speciesLink (<http://splink.cria.org.br>) e da equipe da Universidade Federal de Goiás.

Pode-se verificar que para o conjunto de dados levantados existem coletas de barueiro em todos os estados brasileiros que compõem a distribuição natural da espécie conforme Ribeiro et al. (2000), exceto no Amazonas. Além disso, houve a ocorrência de uma coleta no estado do Pará (município de São Félix do Xingu) que não faz parte dos estados de distribuição por esta referência. Também é interessante notar ocorrência de um ponto de coleta na Bolívia, que faz parte da distribuição pouco explorada da espécie em pesquisas científicas.

Esse levantamento é interessante para se ter uma ideia da distribuição natural de *D. alata* no Brasil, verificar seus pontos de maior ocorrência e a dinâmica de ocupação da espécie no bioma. Deve-se levar em conta, no entanto, alguns vieses provocados pela grande quantidade de ponto de coleta no entorno do Distrito Federal e norte goiano em função da proximidade com centro de estudos como a Embrapa Cerrados e a Universidade de Brasília. O Vale do Araguaia, por exemplo, é uma região de ampla ocorrência do barueiro que deve ter suas populações melhor estudadas.

#### **2.2.4 Utilidades**

As sementes de barueiro constituem uma fonte significativa de lipídios, proteínas, além de fibras alimentares e minerais, sugerindo sua utilização na alimentação humana e animal. Possuem boas fontes de macro e micronutrientes essenciais, como potássio, fósforo e manganês e o elevado grau de insaturação do óleo da semente de barueiro favorece seu uso para fins comestíveis, se eliminadas eventuais substâncias nocivas à saúde (Takemoto et al., 2001). Foi verificada a presença de inibidor de tripsina em sementes cruas, de modo que seu consumo *in natura* não é recomendado (Ribeiro et al., 2000).

O barueiro apresenta um aproveitamento quase total dos frutos colhidos, com perda mínima de sementes, tornando ainda mais compensadora a atividade de beneficiamento (Botezelli et al., 2000). Os frutos, quando maduros, podem ser coletados no chão ou semi- maduros na árvore. O sabor da semente do barueiro se assemelha ao do amendoim. É utilizada para enriquecer pães, bolos, sorvetes, acompanhar aperitivos ou para fazer doces e paçoquinhas (Almeida, 1998).

Sabendo da importância nutricional da castanha do barueiro para a alimentação, como forma de contribuir para a redução das insuficiências nutricionais de

jovens e crianças, a prefeitura de Goiânia, em 2001, introduziu farinha de baru no cardápio da merenda escolar da rede municipal. A farinha é usada na canjica, substituindo o coco ralado. Além de ter um maior valor nutritivo, a novidade ajudou a reduzir custos - a refeição de canjica feita com coco ralado custava em média R\$ 0,40; com a farinha de baru, este valor caiu para R\$ 0,21 (Néri, 2004).

Outras formulações de receitas que utilizam a farinha de baru mostram um aumento significativo no conteúdo nutricional do produto. Na confecção de biscoitos tipo *cookie*, utilizando 8% de farinha de baru, foi evidenciada uma contribuição substancial para a melhoria do valor nutritivo, pela elevação dos teores de lipídeos (16,96%), proteína (29,05%), ferro (31,73%), cálcio (64,74%) e fibra (893,33%), em relação a biscoitos produzidos sem esta farinha. Essa composição de 8% é ideal, pois não afeta a resistência à quebra, a aparência, o sabor e a textura do biscoito (Soares Júnior et al., 2007).

Quando o barueiro se encontra nas áreas de pastagens não é raro ver o gado se alimentando da polpa dos frutos que caem no chão ou até mesmo das folhas da árvore (Figura 2.10). Oliveira (1999) avaliou a influência de árvores nativas (barueiro e pequizeiro) no sistema solo-planta em pastagem de *Brachiaria decumbens* Stapf no Cerrado. Concluiu que embora não tenha aumentado o rendimento da forragem, a presença de árvores, principalmente do barueiro, aumentou o conteúdo de nutrientes na forragem, reduziu a velocidade de secagem e aumentou a disponibilidade de nutrientes no solo. Sendo assim, as plantas de baru tornam-se bastante úteis em áreas de pastagem, servindo como alimento para o gado e contribuindo para a qualidade do solo.

O óleo do barueiro é usado como matéria-prima para a indústria farmacêutica, sendo empregado como antirreumático e com propriedades sudoríferas, tônicas e reguladoras da menstruação. Na indústria oleoquímica é usado em tabacaria como aromatizantes do fumo (Almeida et al., 1998). No que se refere à composição química do óleo do barueiro, verifica-se que este apresenta altos graus de insaturação (acima de 80%) devido principalmente à predominância dos ácidos oleico (50,4%) e linoleico (28,9%), este último considerado essencial (Takemoto et al., 2001). Sendo assim, a composição de ácidos graxos evidencia mais uma vez a qualidade do fruto para uso na alimentação humana. Entretanto, é importante lembrar que esta composição também é adequada para a utilização do óleo como matéria prima para produção de biodiesel, uma vez que altos graus de ácido oleico, como os que são encontrados na castanha do barueiro (entorno de 50% em

média) são bastante favoráveis para esta finalidade. *D. alata* está na lista das espécies com potencial de utilização para a produção de biodiesel (Teixeira et al., 2006).



**Figura 2.10.** Barueiro (*Dipteryx alata*) em área de pastagem. Foto: Lázaro José Chaves, Água Boa – MT, setembro de 2004.

A madeira do barueiro apresenta cor clara, compacta, resistente às pragas e com alta durabilidade, sendo própria para construção de estruturas externas, construção naval e civil. É utilizada também para a confecção de móveis (Almeida et al., 1998; Sano et al., 1999). A madeira é também adequada para a produção de energia como lenha e para a produção de carvão, entretanto é salientado que a utilização desta espécie para esses fins não deve ser realizada de forma extrativista em alta escala e sem manejo (Paula, 1999).

O barueiro é considerado uma espécie ornamental devido à sua copa larga, com bonita folhagem e ramos que conferem resistência ao vento. Além disso, mesmo nos períodos mais secos a árvore continua a proporcionar ótima sombra. De modo que, além do paisagismo pode ser também utilizada para o reflorestamento (Almeida et al., 1998).

Em função da amplitude de possibilidades de utilização do barueiro pode-se concluir que a espécie é bastante promissora, em termos de utilização pelos agricultores familiares como mais uma fonte de renda. Visando o uso do barueiro por exploração extrativista, foi constituída, no ano 2000, a Rede de Comercialização Solidária de

Agricultores Familiares e Extrativistas do Cerrado, que reúne 1.238 famílias, localizadas em 37 municípios dos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia. Esse projeto foi encabeçado pelo Centro de Desenvolvimento Agroecológico do Cerrado (Cedac), uma organização não-governamental dedicada a promover o desenvolvimento sustentável do Cerrado (Néri, 2004).

Para garantir a comercialização coletiva dos agroextrativistas da Rede foi constituída a Cooperativa Mista de Agricultores Familiares, Extrativistas, Pescadores, Vazanteiros e Guias Turísticos do Cerrado (Coopcerrado), que comercializa o resultado de todo processo de organização. Os produtos oferecidos pela rede têm a marca “Empório do Cerrado” e são comercializados para supermercados, escolas, lojas de produtos naturais e feiras (Silva & Egito, 2005). São comercializados a castanha torrada, a farinha, a granola e os cookies. A Tabela 2.1 resume a participação e os resultados obtidos pela rede entre os anos de 2000 e 2003.

**Tabela 2.1.** Evolução das abrangências geográfica e social, dos volumes produzidos e da receita média obtida com a produção de barueiro (*Dipteryx alata*) por agricultores extrativistas assistidos pelo Cedac - Centro de Desenvolvimento Agroecológico do Cerrado (Silva & Egito, 2005).

Indicadores	Ano			
	2000	2001	2002	2003
Nº de municípios	4	2	6	18
Nº de famílias participantes	24	21	55	550
Produção total (kg)	13.280	21.680	22.520	321.140
Receita líquida média por família (R\$)	271,13	506,89	204,5	350,33

Segundo os dirigentes do projeto, para garantir o uso sustentável dos recursos do Cerrado, os associados se comprometem a respeitar alguns princípios comuns. É obrigatório deixar pelo menos 10% dos frutos no pé para permitir uma reprodução saudável; é proibido pôr fogo nas terras para facilitar a colheita; é proibido usar mão-de-obra infantil ou escrava e; as mulheres e os homens recebem igualmente por seu trabalho, de acordo com a produção (Néri, 2004).

O Cedac tem também estudos sobre a possibilidade de uso do resíduo da exploração da amêndoa do barueiro, a casca do fruto, como “carvão ecológico”. Foi verificado que a casca resultante da extração da castanha do barueiro tem excelentes possibilidades de valorização energética, podendo ser utilizada em queima direta ou

transformado em carvão vegetal. A casca é de fácil secagem, ao ser exposta ao ar livre, permanecendo com baixo teor de umidade. O tamanho homogêneo e reduzido facilita a embalagem, transporte, estocagem e permite alimentação automática de caldeiras em processos industriais. Possui poder calorífico elevado, superior ao da lenha residencial ou comercial, quando seca ao ar livre. Apresenta facilidade para compactação, podendo ter sua densidade energética aumentada, formando briquetes com boa resistência mecânica e elevada densidade. Verificou-se também que o carvão obtido é de boa qualidade e de fácil carbonização em fornos metálicos pequenos ou construídos e adaptados para tijolos, utilizados para carbonização de cocos (Ortiz, 2005).

### **2.2.5 Estudos populacionais do barueiro: implicações para o uso e conservação**

Siqueira et al. (1993), num estudo preliminar, avaliaram altura e diâmetro de progênies e procedências de barueiro em diferentes idades, para fins de conservação *ex situ*. Com base nas características avaliadas, foi verificado que o barueiro tem desenvolvimento lento, de modo que os autores recomendam o uso da espécie para produção de madeira em longo prazo e para plantios de conservação genética. As estimativas de coeficiente de variação genética e do coeficiente de herdabilidade (sentido restrito) foram mais altas em idades mais jovens, tendendo a decrescer posteriormente, estabilizando-se por algum tempo e voltando a crescer novamente com o avanço da idade. O coeficiente de variação dentro de progênies evidenciou diferenças bastante acentuadas. Este estudo sugere ainda que o barueiro seja uma espécie alógama, com base na relação entre a variância dentro de progênies e a variância entre progênies. Entretanto os autores ressaltam a importância de se realizarem estudos mais adequados para a determinação do sistema reprodutivo da espécie, como os métodos diretos de cruzamento ou o uso de marcadores codominantes.

Outros estudos revelam que o barueiro apresenta desenvolvimento moderado, com índice de sobrevivência de 100%. Estudos de procedências e progênies do barueiro mostraram diferenças no crescimento, além disso, a fase de frutificação se inicia a partir de quatro a cinco anos após o plantio. Para as variáveis altura, DAP (diâmetro de altura ao peito) e características morfológicas de fruto e semente, os valores de herdabilidade se apresentam de médio a alto, demonstrando que a espécie é promissora em um programa de

seleção, com ampla variabilidade genética (Sano et al., 1999; Correa et al., 2000a). Apesar da diferença morfológica entre frutos e sementes ser comprovada, são encontrados, em geral, altos valores de germinação (entre 90 e 100%) para as procedências estudadas, não havendo diferenças significativas entre elas (Botezelli et al., 2000, Correa et al., 2000b; Correa et al., 2008).

Sano (2001) estudou o crescimento inicial do barueiro sob diferentes intensidades de luz e solos, utilizando-se sementes com características morfológicas distintas de diferentes árvores e concluiu que a alta intensidade de luz foi limitante no crescimento inicial da planta. Mas fatores edáficos, além da fertilidade, também afetaram o seu desenvolvimento. Também verificou alocação de recursos diferenciada entre progênies para diferentes órgãos da planta ao longo do seu desenvolvimento, o que deve influenciar no desempenho dos indivíduos sob condições menos favoráveis. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Melhem (1975b).

Os parâmetros genéticos relativos à qualidade do sistema radicular de mudas de barueiro foram estimados por Oliveira et al. (2006). Neste estudo, a análise de variância revelou a existência de variação significativa entre as progênies quanto aos caracteres: comprimento total e volume de raízes, diâmetro médio e número de raízes finas. Foram observados também, altos valores de herdabilidade e coeficiente de variação genética, além de correlações positivas entre comprimento total, volume e número de raízes finas, indicando que, se a seleção for praticada para qualquer um dos caracteres citados, influenciará positivamente os demais. Isso sugere, segundo os autores, que altos ganhos genéticos podem ser obtidos mediante a seleção de matrizes.

Embora alguns pesquisadores tenham avaliado a variabilidade genética existente em diversas procedências no país, visando subsidiar programas de conservação e melhoramento genético do barueiro, Torres (2001) ressalta que os estudos ainda são escassos, havendo a necessidade de avaliação genética de indivíduos em idades avançadas e do estudo de estrutura genética de populações naturais. Com este intuito, Soares et al. (2008a), com base em 45 locos RAPD, avaliaram a magnitude e a distribuição da variabilidade genética em dez subpopulações naturais de barueiro, amostradas em cinco regiões dentro da área de distribuição da espécie. Nesse trabalho, verificou-se que as subpopulações de barueiro apresentam níveis consideráveis de diversidade genética e que a variabilidade genética se encontra significativamente estruturada entre as subpopulações (15%), sendo a maior parte devido ao componente entre regiões (10%). A variabilidade

genética apresentou-se autocorrelacionada espacialmente, sendo encontrados valores significativos e positivos ( $r = 0,258$ ;  $p = 0,048$ ; 10000 permutações) entre subpopulações que distam em até 400 km. Quando essa análise foi feita dentro de subpopulações, foi possível verificar que a espécie tende a formar grupos de vizinhança com estruturação genética em parentesco ou familiar (Soares et al., 2008b).

Estes trabalhos contribuíram para se ter uma visão geral da composição e distribuição espacial da variabilidade genética em *D. alata*. Entretanto, os estudos com marcadores codominantes são importantes para a obtenção de informações mais refinadas sobre as estratégias de cruzamento, o sistema reprodutivo e os padrões de fluxo gênico histórico e atual que estão norteados os processos microevolutivos nas subpopulações dessa espécie. Esses dados podem permitir a proposição de estratégias e programas mais eficiente de conservação e uso sustentável da espécie *D. alata*.

### 2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL

O termo biodiversidade refere-se à variedade de ecossistemas, comunidades e populações, levando-se em conta a diversidade genética dentro de uma espécie (Solé-Cava, 2001). A ação humana direta ou indireta tem destruído a diversidade biológica em proporções comparadas às cinco extinções em massa reveladas pelo registro fóssil, o que faz com que alguns autores considerem esta destruição coma a sexta extinção em massa da história evolutiva (Frankham et al., 2008).

A Genética da Conservação é uma disciplina que, em sentido restrito, se baseia no uso da teoria e das técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas (Frankham et al., 2008). Em sentido amplo, ela inclui o uso das análises genético-moleculares para elucidar aspectos da biologia das espécies que sejam relevantes para o seu manejo e conservação (Diniz-Filho et al., 2008). O seu principal objetivo é preservar o potencial evolutivo das espécies, frente às mudanças ambientais (Frankham et al., 2008). Deste modo, o conhecimento da composição genética de uma espécie, bem como da maneira como ela está organizada (estruturada) em suas populações, é fundamental para o estabelecimento de ações que visem o seu manejo, conservação e/ou uso (Vencovsky et al., 2007).



A composição genética das populações é habitualmente medida em termos de suas frequências alélicas, número de alelos e locos polimórficos e heteroziguidade, mais amplamente medida pelas expressões de Nei (1973; 1978) (Frankham et al., 2008). A medida de diversidade genética com base na heteroziguidade esperada ( $H_e$ ) de Nei equivale à soma de todos os heterozigotos possíveis em um loco, assumindo-se Equilíbrio de Hardy-Weinberg, dada por:  $H_e = 1 - \sum p^2$ . Portanto, quanto maior a equidistribuição dos alelos nos indivíduos (genótipos) maior será o valor de  $H_e$ , sendo que para um loco com dois alelos este valor máximo é de 0,5 (Vencovsky et al., 2007).

A distribuição da variabilidade genética está associada à forma como os alelos e genótipos estão distribuídos no tempo e no espaço, seja entre populações geograficamente distintas, ou dentro de um grupo local. Desta maneira, a estrutura genética populacional corresponde à forma como a variabilidade genética está distribuída na metapopulação, assim como ao grau de endogamia entre elas.

As denominadas “estatísticas F hierárquicas” de Wright descrevem a estrutura genética das populações, em que:  $F_{ST}$ , mede a correlação de alelos entre indivíduos dentro de subpopulações e reflete o grau de diversidade genética entre elas.;  $F_{IT}$  mede a correlação entre alelos dentro de indivíduos, considerando todos os indivíduos da população;  $F_{IS}$ , mede a correlação entre genes dentro de indivíduos e dentro de subpopulações (Wright, 1951; Robinson, 2006). O valor do  $F_{ST}$  mede o chamado efeito *Wahlund*, que indica uma deficiência na proporção de heterozigotos em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse efeito se dá pelo não conhecimento prévio da existência de duas ou mais subpopulações geneticamente diferentes na amostra total analisada e, assim, indica o grau de estruturação da população total (Wright, 1943; Diniz-Filho, 1998).

O desenvolvimento das técnicas moleculares, estatísticas e computacionais possibilitou um grande avanço das análises genéticas populacionais. Outras estatísticas específicas foram introduzidas para se avaliar a estrutura genética das populações. Dentre elas podem-se citar o índice  $G_{ST}$ , que é equivalente ao  $F_{ST}$ , mas é baseado na decomposição dos índices de diversidade genética e considera, diferentemente do  $F_{ST}$ , que as subpopulações têm pesos iguais, independente do tamanho amostral de cada uma; e o índice  $N_{ST}$ , análogo ao  $F_{ST}$  e ao  $R_{ST}$  (que é específico para dados microssatélites) (Slatkin, 1995), que considera a distância entre os alelos de cada loco (“alelos ordenados”) na estimativa da estrutura genética populacional (Pons & Petit, 1996).

O sistema reprodutivo é um dos principais fatores que influenciam a estrutura e a dinâmica da variabilidade genética nas plantas (Bawa, 1979; Loveless & Hamrick, 1984). As espécies que se reproduzem preferencialmente por fecundação cruzada mantêm níveis maiores de variabilidade genética dentro das populações, enquanto as que realizam autofecundação com maior frequência, mantêm a maior parte da variabilidade genética entre as populações. Em função desses fatores, a avaliação da taxa de fecundação cruzada é importante para reconhecer os efeitos do sistema reprodutivo na manutenção da variabilidade genética nas populações naturais (Ritland & Jain, 1981; Kageyama et al., 1998; Ward et al., 2005; Lacerda et al., 2008a).

Os principais fatores evolutivos que determinam o padrão de estrutura genética populacional são o fluxo gênico, que é intrinsecamente relacionado ao sistema de reprodução da espécie, e a deriva genética local, que é mais acentuada quanto menores forem as populações. O fluxo gênico tende a diminuir a divergência genética entre as populações e a deriva genética tende a homogeneizar internamente as populações e diferenciá-las entre si, de modo que a magnitude da diferenciação dependerá do balanço entre estas forças evolutivas (Slatkin, 1987; Vencovsky et al., 2007).

Para um conjunto de populações (metapopulação) podem-se assumir vários modelos para descrever o padrão de fluxo gênico, dentre os quais podem-se citar (Futuyma, 1992):

- modelo “continente-ilha”, no qual efetivamente existe um movimento unidirecional de uma subpopulação grande para uma menor e isolada;
- modelo de “ilha”, no qual a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas subpopulações;
- modelo de “alpondras” (*stepping-stone*), no qual cada subpopulação recebe migrantes somente de subpopulações vizinhas;
- modelo do “isolamento pela distância”, no qual o fluxo gênico ocorre localmente entre vizinhos, em uma subpopulação de distribuição contínua.

Um dos métodos indiretos de estimativa da taxa de fluxo gênico em populações naturais mais amplamente utilizados é o que se baseia no índice de subdivisão populacional,  $F_{ST}$ , assumindo modelo de fluxo gênico em “ilhas” e equilíbrio entre migração e deriva. Este modelo assume que todas as subpopulações exibem a mesma taxa

de fluxo gênico. A estimativa é feita da seguinte maneira:  $Nm = \frac{1}{4} \left( \frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$ , em que,  $Nm$

equivale ao número médio de migrantes por geração (Wright 1951; Slatkin, 1987; Sork et al., 1999).

Com a possibilidade de avaliar marcadores moleculares provenientes do genoma herdado de modo biparental e maternal é possível distinguir entre as contribuições relativas do pólen e da semente para o fluxo gênico total entre populações de plantas. Isto é feito pelo cálculo da taxa aparente de migração via pólen e via semente, com base na estimativa do  $F_{ST}$  para cada conjunto de dados moleculares, ( $F_{STb}$ , para dado de microssatélite genômico e  $F_{STm}$ , para o de microssatélite cloroplastidial) conforme a expressão (Ennos, 1994, Sork et al., 1999):

$$r = \frac{m_p}{m_s} = \frac{\left[ \left( \frac{1}{F_{STb}} - 1 \right) (1 + F_{IS}) - 2 \left( \frac{1}{F_{STm}} - 1 \right) \right]}{\left( \frac{1}{F_{STm}} - 1 \right)}$$

$F_{IS}$  refere-se ao índice de fixação intrapopulacional, que é estimado a partir dos dados provenientes do genoma nuclear (microssatélites genômicos) (Ennos, 1994; Petit et al., 2005).

Em populações de plantas, a maneira como os indivíduos se distribuem no espaço físico dependem em geral dos limites estabelecidos por variáveis ecológicas; do modo de reprodução e mecanismos de dispersão; da atuação local da seleção natural, deriva genética e de eventos demográficos estocásticos (Loveless & Hamrick, 1984; Robinson, 2006). A situação estática das plantas aliada à maneira como estes fatores atuam nas populações naturais, pode levar à formação de vizinhança genética, que é tanto maior quanto mais intenso for o fluxo gênico (Robinson, 2006).

Apesar da grande importância para os estudos genético-populacionais, a avaliação da estrutura genética populacional e das taxas de migração baseadas no estimador  $F_{ST}$  compõe apenas as medidas de caracterização primária da variabilidade genética existente. Deste modo, para fazer inferências sobre os processos microevolutivos que atuam nas populações, é necessário que sejam efetuados estudos com base em técnicas mais elaboradas como, por exemplo, as de análise de autocorrelação espacial (Diniz-Filho, 1998; Escudero et al., 2003; Pearse & Crandall, 2004). A estrutura espacial das populações naturais pode ser resultado de processos atuais (principalmente fluxo gênico) ou ser reflexo de processos que atuaram no passado, ao longo da história evolutiva, atuando ao longo de

toda a distribuição da espécie. O padrão espacial da variabilidade genética pode indicar os processos naturais que ocorrem (ou ocorreram) nas populações (Epperson, 1997; 2003).

Os marcadores moleculares têm tornado possível distinguir estrutura genética dentro e entre populações, auxiliando no esclarecimento dos padrões de fluxo gênico, dispersão e seleção (Cavers et al., 2005). Aliados às técnicas de autocorrelação espacial, estes possibilitaram o aprimoramento dos métodos de análise permitindo a estimativa do fluxo gênico aparente dentro de populações, com base na estrutura genética espacial entre as plantas (Epperson, 2003; Fenster et al., 2003; Vekemans & Hardy, 2004). A estrutura genética que tradicionalmente era avaliada apenas em grandes escalas espaciais, entre subpopulações, passou também a ser feita em escala local (Degen, 2001; Hardy, 2003).

Normalmente na área de distribuição geográfica de uma dada espécie as populações centrais são mais densas, contínuas e exibem maior variabilidade genética do que as periféricas. A baixa variabilidade genética das populações periféricas pode estar relacionada, dentre outros fatores, tanto com o pequeno tamanho populacional quanto com os efeitos locais da seleção natural (Soulé, 1973; Pujol & Pannell, 2008). Recentemente, tem sido realizados alguns trabalhos cuja intenção é testar a existência de diferença na magnitude e composição da variabilidade genética entre populações centrais e periféricas de uma dada espécie (Arnaud-Haond et al., 2006; Bridle & Vines, 2007; Eckert et al., 2008). A importância de se estudarem estes padrões está relacionado ao fato de que, com menor tamanho populacional e variabilidade genética, as populações periféricas estariam mais sujeitas à extinção local (Pujol & Pannell, 2008).

## 2.4 MARCADORES MICROSSATÉLITES

Desde os anos 60, vários experimentos demonstraram que os genomas de eucariotos são densamente povoados por regiões cujas sequências de diversos tamanhos em pares de bases ocorrem repetidas em tandem às vezes por milhares ou até milhões de cópias. O termo “DNA satélite” surgiu da observação de resultados de experimentos que utilizaram a técnica de ultracentrifugação em equilíbrio com cloreto de cério, que permite a separação de macromoléculas a partir de diferenças em suas densidades, fazendo com que moléculas de mesma densidade concentrem-se na mesma região do tubo de centrífuga. Quando amostras de DNA total são submetidas a esta técnica são observadas, acima e

abaixo da maior parte do DNA, frações que consistem em bandas definidas, que foram denominadas como “DNA satélite” (Matioli & Passos-Bueno, 2001; Ellegren, 2004).

Os DNA satélites estão localizados na heterocromatina, principalmente ao redor do centrômero ou, mais raramente, no telômero. Entre organismos diferentes, o tamanho das unidades de repetição pode variar consideravelmente, sendo que, a proporção de DNA satélite no DNA genômico total de uma espécie varia normalmente entre 1 % e 65% (Madalena, 2008).

Este grupo de sequências de DNA altamente repetitivo foi dividido convencionalmente em diferentes tipos de marcadores, de acordo com o tamanho da sequência que é repetida. Assim, chama-se de DNA satélite o grupo que possui trechos longos repetidos (cerca de 100pb a 500pb); de DNA minissatélite aquele com sequências médias repetidas e de DNA microssatélites aquele com sequências bem curtas repetidas. Entretanto, os limites entre estas três classes são bastante arbitrários (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Matioli & Passos-Bueno, 2001).

Os microssatélites, STR (*Short Tandem Repeats* – Sequências curtas Repetidas) ou SSR (*Simple Sequence Repeats* – Sequências Simples Repetidas) possuem sequências em geral pequenas, formadas por arranjos de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem (Hillis et al., 1996; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Goldstein & Schlötterer, 2001).

Os marcadores microssatélites são classificados como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos de acordo o tipo de sequência repetida que os compõe. Nos microssatélites perfeitos a sequência de repetição não é interrompida por nenhuma base diferente das que compõem seu motivo (por exemplo, TATATATATATATA) enquanto que nos imperfeitos verifica-se uma base diferente entre os motivos de repetição (por exemplo, TATATATACTATATA). Nos microssatélites interrompidos são verificadas uma pequena sequência dentro da sequência repetitiva diferente da do seu motivo (por exemplo, TATATACGTGTATATATATA), enquanto que os microssatélites compostos são formados por sequências repetitivas adjacentes com diferentes composições de motivos (por exemplo, TATATATATAGTGTGTGTGT) (Oliveira et al., 2006).

Os microssatélites são abundantes e amplamente distribuídos no genoma dos eucariotos, sendo que sua ocorrência se dá em diferentes regiões genômicas e as taxas com as quais elas ocorrem nestas regiões variam entre os grupos de organismos (Tóth et al., 2000; Zane et al., 2002; Li et al., 2002; 2004), sendo que a ocorrência de regiões

microssatélites tende a diminuir com o aumento do tamanho dos motivos que a compõem (Sharma et al., 2007). Recentemente, têm sido realizado muitos estudos mostrando que a distribuição não aleatória dos microssatélites no genoma dos organismos pode estar relacionada a algumas importantes funções no que diz respeito ao controle da expressão gênica entre outras (Li et al., 2002; Kashi & King, 2006).

Há indícios que o genoma de plantas tenha, em média, dez vezes menos microssatélites dinucleotídicos do que o genoma humano. A frequência de microssatélites no genoma de cloroplasto (1 por 317 kb) é baixa quando comparada ao genoma nuclear. As repetições nucleotídicas mais frequentes nas plantas são  $(AT)_n$ , seguidas de  $(GA)_n$  e  $(AC)_n$ ; as trinucleotídicas são  $(AAT)_n$  e  $(AAC)_n$  e as tetranucleotídicas são  $(AATT)_n$  e  $(AAAT)_n$  (Ciampi et al., 2007).

Os diferentes alelos de um loco microssatélite distinguem-se uns dos outros pelo número de unidades (motivos) de repetição que apresentam nos cromossomos homólogos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Normalmente, os locos microssatélites exibem uma grande quantidade de alelos que faz com que eles sejam especialmente úteis para análises de identificação individual e em estudos genético populacionais de modo geral (Oliveira et al., 2006; Selkoe & Toonen, 2006; Sharma et al., 2007), em função da alta taxa de mutação destas regiões que variam entre  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  nucleotídeos por loco por geração (Goldstein & Schlötterer, 2001).

Existem vários modelos que procuram explicar os mecanismos de mutação em regiões microssatélites, dentre os quais podem-se citar: o *modelo de alelos infinitos*, em que qualquer alelo pode surgir aleatoriamente, a partir de outro preexistente, e com a mesma taxa de mutação; o *modelo stepwise* em que um alelo surge pelo ganho ou perda de um motivo, sendo que estes alelos são tanto mais parecidos quanto mais parecidos forem seus tamanhos; o *modelo two phase* que surgiu como uma extensão do modelo *stepwise*, e prediz que a maioria dos eventos mutacionais resultam do aumento ou diminuição de um único motivo e que as alterações envolvendo muitos motivos de uma só vez são muito raras; o *modelo k-alleles* que assume que existem exatamente  $k$  alelos possíveis em um dado loco e que a probabilidade de um alelo mutar é dada por  $\mu/(k-1)$ , em que  $\mu$  é a taxa de mutação (Oliveira et al., 2006). A aplicação ou adequação de cada um destes modelos para estudos com marcadores microssatélites tem uma relação com a composição do motivo de repetição (di, tri, tetra etc) e com o tamanho das repetições em tandem (Ellegren, 2004).

A obtenção das regiões microssatélites envolve uma série de passos, sendo que o primeiro deles consiste na identificação das sequências, que podem ser obtidas diretamente de bibliotecas genômicas, bibliotecas de cDNA, bibliotecas enriquecidas para sequências microssatélites, ou ainda a partir de sequências depositadas em bancos como o GenBank (Zane et al., 2002; Gao et al., 2003). Com a conclusão do projeto genoma, a capacidade de sequenciamento aumentou muito em escala, em função da diminuição do seu custo total e do desenvolvimento de várias técnicas mais robustas (Hutchison, 2007; Shendure & Ji, 2008). O método de *Sample Sequencing* (sequenciamento de DNA por amostragem), também chamada de *Random Sequencing* (sequenciamento aleatório de DNA), aliado a uma estratégia de clonagem *Shotgun DNA Sequencing* foi proposto durante o desenvolvimento do projeto genoma humano e tem sido muito utilizado para estudos sobre a estrutura e composição do genoma dos organismos (Venter et al., 1998; Aparicio et al., 2002). Esta técnica é uma estratégia interessante, pois apresenta grande poder informativo de alta capacidade de detectar regiões de repetições em tandem com diferentes composições de motivos e distribuídas aleatoriamente no genoma, de modo rápido e eficiente. Depois que as regiões microssatélites são identificadas, o próximo passo é a síntese de iniciadores específicos, construídos com base na sequência de pares de bases que flanqueiam as regiões das SSR (Brondani et al., 2007).

A detecção das SSR é feita por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida ou agarose de alta resolução, pois estas sequências exigem uma matriz com melhor poder de separação uma vez que, além de serem pequenas, as diferenças entre elas são sutis, ou seja, composta por poucos pares de bases (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os microssatélites do cloroplasto representam uma classe poderosa de marcadores com muita utilidade para estudos populacionais em plantas. O desenvolvimento de marcadores microssatélites cloroplastidiais universais para angiospermas dicotiledôneas (Weising & Gardner, 1999) abriu uma perspectiva que pode facilitar a utilização desses marcadores para muitas espécies de plantas, uma vez que estes locos têm apresentado altos níveis de variabilidade genética inter e intraespecífica (Provan et al., 2001). Os estudos que combinam o uso de locos microssatélites genômicos e cloroplastidiais têm fornecido importantes informações sobre a estrutura, fluxo gênico e relação histórica entre as populações de plantas (Collevatti et al., 2003; Petit et al., 2005; Martins et al., 2006, Edh et al., 2007).

### **3 SEQUENCIAMENTO “SHOTGUN” PARA O DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM *Dipteryx alata* VOGEL**

#### **RESUMO**

Os marcadores microssatélites, por serem codominantes, multialélicos, abundantes e bem distribuídos ao longo do genoma, são eficientes para avaliar a variabilidade genética em populações naturais, o que é importante para a sugestão de estratégias de conservação e uso das espécies vegetais. Este estudo utiliza uma estratégia de desenvolvimento de iniciadores que se baseia no sequenciamento aleatório de fragmentos provenientes de uma biblioteca genômica “shotgun” para a detecção de regiões microssatélites, em barueiro. Das 668 sequências obtidas, foram encontradas 12 regiões microssatélites que possibilitaram a construção dos pares de iniciadores. Estas regiões são compostas por motivos com dois a seis nucleotídeos, que variam entre 136 a 380 pb. Isto mostra que a estratégia de sequenciamento aleatório a partir de bibliotecas “shotgun” é interessante por possibilitar a obtenção de iniciadores para regiões repetitivas com diferentes motivos. Dois destes locos (Da\_E06 e Da\_E12) foram polimórficos, apresentando três alelos cada. As estimativas de  $H_e$  para estes locos apresentaram valores satisfatórios, considerando o número de alelos, e foram iguais a 0,2946 e 0,2879, respectivamente. Isto indica que os iniciadores desenvolvidos e padronizados com sucesso neste trabalho podem ser utilizados para estudos genético populacionais.

*Palavras-chave:* baru, iniciador, sequenciamento aleatório, SSR.

#### **ABSTRACT**

### **SHOTGUN SEQUENCING TO MICROSATELLITE MARKERS DEVELOPMENT IN *Dipteryx alata* VOGEL**

The microsatellites markers, for being co-dominants, multiallelics, abundant and distributed along the genome, are efficient to evaluate the genetic variability of natural



populations, that is important for the suggestion of conservation strategies and use of the plants species. This study used a strategy of primers development that is based on the random sequencing of fragments originated from a "shotgun" genomic library for the detection of microsatellite regions in *D. alata*. Of 668 sequences obtained, were found 12 microsatellites regions, that were able to the construction of primers. These regions are composed by motives with two to six nucleotides, that vary between 136 to 380 bp. This demonstrated that random sequence strategy from "shotgun" libraries is interesting, because possible to obtain primers for repetitive regions with different motives. Two of these locos (Da\_E06 and Da\_E12) were polymorphic, with three alleles each one.  $H_e$  estimates for these locus, considering the alleles number, presented satisfactory values, equals to 0.2946 and 0.2879, respectively. This indicates that primers developed and standardized with success in this work can be used for population genetics studies.

*Key words:* "baru" tree, primers, random sequencing, SSR.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O barueiro (*Dipteryx alata*) é uma árvore da Família Fabaceae, nativa do Cerrado, que é utilizada pela população regional como fonte complementar de renda familiar, principalmente pela exploração extrativista. Devido à sua ampla possibilidade de uso e por apresentar alta taxa de germinação e estabelecimento de mudas, o barueiro é uma das espécies mais promissoras para o cultivo (Sano et al., 2004; Felfili et al., 2004).

*D. alata* apresenta uma grande importância ecológica dentro do bioma Cerrado, pois é uma das poucas plantas nativas do Cerrado que amadurece seus frutos na estação seca, sendo importante para a alimentação de várias espécies de animais, incluindo insetos, aves e mamíferos (Sano et al., 2004).

A atividade extrativista desordenada tem contribuído, ao lado da urbanização e da expansão da agricultura, para o declínio da vegetação natural do bioma Cerrado. Por outro lado, apenas o extrativismo pode ser insuficiente para cobrir as demandas por um determinado produto. Diante disto, percebe-se que o plantio racional se faz necessário para algumas espécies de amplo interesse econômico como o barueiro, entretanto existe uma

grande carência de estudos que auxiliem na sua conservação, domesticação e uso racional (Felfili et al., 2004).

O conhecimento da variabilidade genética de uma espécie nativa é fundamental para auxiliar na definição de estratégias eficientes para a sua conservação e uso. Os marcadores microssatélites, por serem codominantes, multialélicos, abundantes e bem distribuídos ao longo do genoma, são eficientes para avaliar a variabilidade genética em populações naturais (Brondani et al., 1998; Ciampi et al., 2007).

Apesar dos significativos avanços obtidos no desenvolvimento de marcadores microssatélites nos últimos anos, para a grande maioria das espécies vegetais não existem marcadores publicamente disponíveis. A limitação inicial para o uso desses marcadores reside na necessidade do desenvolvimento de iniciadores específicos, que demandam uma estrutura laboratorial adequada e mão-de-obra especializada (Ciampi et al., 2007; Brondani et al., 2007). Programas de parceria entre instituições científicas têm dado suporte e possibilitado o desenvolvimento de marcadores microssatélites para espécies menos estudadas, como no caso das nativas do Cerrado.

Os SSR podem ser obtidos diretamente de bibliotecas genômicas, bibliotecas de cDNA, bibliotecas enriquecidas para sequências microssatélites, ou ainda a partir de sequências depositadas em bancos como o GenBank (Zane et al., 2002; Gao et al., 2003). Nesse estudo, foi proposto o desenvolvimento de uma biblioteca genômica de fragmentos aleatórios, obtida através de clonagem “shotgun”. Trata-se de uma estratégia interessante, de grande poder informativo e que possibilita a busca por regiões de repetições em tandem distribuídas aleatoriamente no genoma. Este estudo utilizou esta estratégia visando o desenvolvimento de marcadores microssatélites para a espécie *D. alata*.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico total, obtido a partir de folhas jovens de barueiro, foi extraído de acordo com o método modificado de Doyle & Doyle (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Aproximadamente 30 µg de DNA foram submetidas a um processo de fragmentação aleatória em diversos tamanhos por meio do processo de sonicação. Os fragmentos derivados tiveram suas extremidades reparadas por tratamento com a enzima Klenow de forma a tornarem-se abruptas. Posteriormente, os fragmentos foram ligados ao

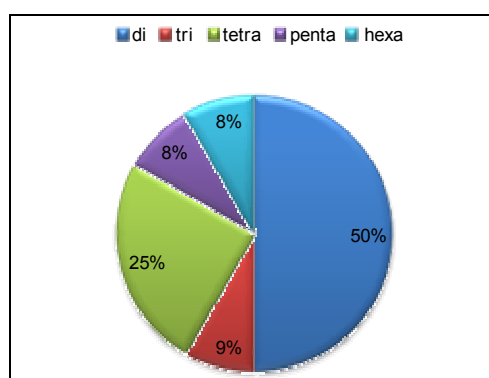
vetor de clonagem pMOSBlue, conforme o kit *pMOSBlue Blunt Ended Cloning* (GE Healthcare). As bactérias, submetidas ao processo de transformação utilizando as construções, foram cultivadas em meio sólido LB acrescido de ampicilina e tetraciclina. As colônias transformantes foram transferidas para meio líquido *Circle Grow* e incubadas a 37° C *overnight*. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o método padrão de lise alcalina e quantificado via eletroforese em gel de agarose 1%, imerso em TBE 10X, com duração de cerca de uma hora (Sambrook et al., 1989). As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando o reagente Dyeamic (GE Healthcare), seguido por purificação dos fragmentos e eletroforese capilar utilizando o sequenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems).

As sequências geradas foram depositadas na plataforma BIOFOCO, Rede de Pesquisa e Desenvolvimento em Bioinformática do Centro-Oeste e, inicialmente avaliadas para qualidade, sendo consideradas como válidas aquelas com um número mínimo de 250 pares de base com phred>20. O desenho dos iniciadores foi efetuado utilizando o software Primer (Lincoln et al., 1991). Foram desenhados pares de iniciadores específicos e únicos, complementares às regiões que flanqueiam as sequências repetitivas, normalmente possuindo entre 18pb e 24 pb de comprimento cada um. Os iniciadores obtidos foram inicialmente avaliados quanto ao padrão de amplificação e especificidade do loco microssatélite utilizando quatro indivíduos. Após o ajuste das condições de amplificação uma amostra, composta por 63 indivíduos, provenientes de 21 subpopulações contendo três plantas cada foi utilizada para a avaliação do polimorfismo dos locos. As reações de PCR foram feitas adicionando-se a 5 µL de DNA, na concentração de aproximadamente 2,5 ng.µL<sup>-1</sup>, 10 µL de um coquetel contendo os reagentes comuns à estas reações, nas seguintes concentrações finais: 0,22 mM de dNTP; 0,26 µM dos iniciadores (F + R); 1X do tampão da enzima e 1,5 mM de cloreto de magnésio; 0,87 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA; 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda); água milli-Q estéril q.s.p. 15 µL. As condições de amplificação no termociclador possui os seguintes passos: (1°) Desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos; (2°) 94°C por 1 minuto; (3°) temperatura específica de anelamento do iniciador por 1 minuto; (4°) Extensão da molécula pela enzima *Taq* DNA polimerase a 72°C por 1 minuto; (5°) 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passo; (6°) Passo final de extensão de 7 minutos a 72°C para finalizar os produtos amplificados.

Os produtos de PCR gerados foram submetidos a um processo de eletroforese vertical utilizando gel desnaturante de poli(acrilamida) desnaturante na concentração de 6% e TBE 1X, com duração de cerca de duas horas a 90 W. Em seguida, a coloração do gel foi realizada com nitrato de prata conforme o protocolo de Creste et al. (2001). A genotipagem foi feita sobre a luz branca pela comparação do tamanho dos alelos de cada indivíduo com o do marcador de massa molecular 10 pb da Invitrogen®. A confirmação da existência e do tamanho de todos os alelos foi feita por meio de uma escada alélica, obtida com base na codificação de uma nova eletroforese dos produtos amplificados arranjados na sequência crescente de tamanho. A planilha de genótipos resultante foi utilizada para as estimativas dos parâmetros de diversidade genética.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 1344 sequências geradas, 668 (50%) foram consideradas válidas e empregadas na busca por regiões microssatélites. Ao todo foram identificadas doze sequências repetitivas com regiões flanqueadoras adequadas para o desenho dos pares de iniciadores. Os microssatélites identificados foram compostos por motivos dos tipos di (seis), tri (um), tetra (três), penta (um) e hexanucleotídicos (um) (Figura 3.1), e tamanho variando de 136 pb a 380 pb (Tabela 3.1), indicando que a estratégia de sequenciamento aleatório a partir de bibliotecas “shotgun” mostrou-se adequada por possibilitar uma economia de tempo e redução de mão-de-obra, além de resultar na obtenção de sequências repetitivas contendo uma variedade de motivos de repetição.

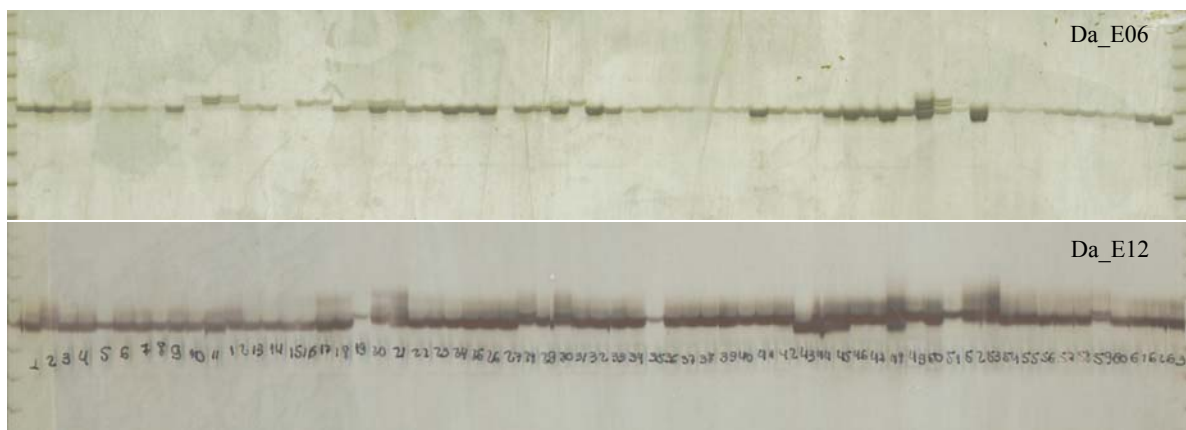


**Figura 3.1.** Proporções de regiões microssatélites identificadas a partir de uma biblioteca genômica “shotgun” para a espécie *Dipteryx alata*, de acordo com o tamanho do motivo.

**Tabela 3.1.** Relação dos cinco locos microssatélites que apresentaram padrão eletroforético satisfatório para 63 plantas da espécie *D. alata*. Em que, Ta é a temperatura de anelamento dos locos;  $H_e$  e  $H_o$  a heterozigosidade esperada e observada, respectivamente; FAN a frequência de alelos nulos; PE e PI equivalem às probabilidades de exclusão e inclusão, respectivamente.

Loco	Iniciador- <i>forward</i> (F)	Iniciador- <i>reverse</i> (R)	Motivo	Ta	Alelos (pb)	$H_e$	$H_o$	FAN	PE	PI
Da_E03	ATGAATCATCCTTTCCACGG	GGATAATGGTAACCCCATCG	(ATAA) <sub>13</sub>	64°C	148	0	0	0	0	0
Da_E06	TGCAGCATAAAAATTGCGAA	TTACCCCAAAGCCTCAAGAA	(AAAT) <sub>17</sub>	60°C	214, 216, 218	0,295	0,161	0,103	0,131	0,614
Da_E08	ACCATTTC AACCGAAAGCAC	GCCAGCTGGAAGCACTTATC	(TA) <sub>11</sub>	60°C	192	0	0	0	0	0
Da_E09	CCAGGAATCCAATCTAACGC	AACTGAGAGATTCCAGATTCC	(TTGG) <sub>18</sub>	60°C	136	0	0	0	0	0
Da_E12	CCTTCTATGCGCTCTCTGCT	TACTTCAACGCCAGCTTCCT	(ATTTT) <sub>18</sub>	64°C	219, 220, 222	0,288	0,143	0,113	0,142	0,581
Total									0,254	0,357

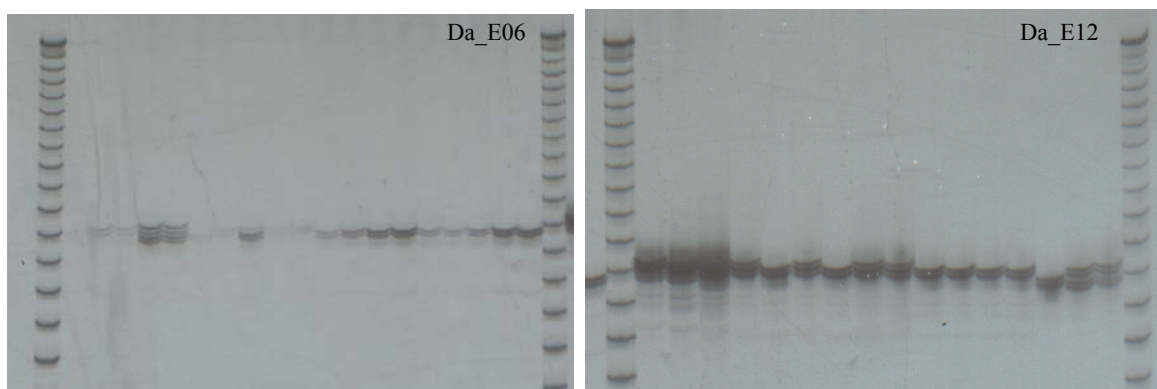
Dez iniciadores foram amplificados com sucesso, utilizando-se quatro indivíduos. Ao avaliá-los com 63 indivíduos, cinco apresentaram padrão satisfatório de amplificação, sendo que dois (Da\_E06 e Da\_E12) foram polimórficos, apresentando três alelos cada (Figura 3.2). A padronização das condições de amplificação foi realizada somente com o ajuste de temperatura de anelamento, pois não houve a necessidade de mudar as concentrações de reagentes nas reações de PCR.



**Figura 3.2.** Eletroforese de dois marcadores microssatélites (Da\_E06 e Da\_E12) desenvolvidos para a espécie *Dipteryx alata* em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata, analisados 63 indivíduos, provenientes de 21 subpopulações. As colunas das extremidades são os marcadores de massa molecular (10 pares de bases, da Invitrogen®).

As escadas alélicas possibilitaram a confirmação da quantidade e tamanho dos alelos de cada loco (Figura 3.3). Verifica-se que a quantidade de alelos foi relativamente baixa, considerando o esperado para locos microssatélites que são multialélicos por

definição (Brondani et al., 1998; Goldstein & Schlötterer, 2001; Ellegren, 2004). Entretanto, esta quantidade inferior de alelos pode estar relacionada com o tamanho dos motivos de repetição destes locos, que são tetra e hexanucleotídeo, no loco Da\_E06 e Da\_E12 respectivamente, uma vez que com motivos maiores são esperadas taxas de mutação menores (Ellegren, 2004). Isto é reforçado pela pequena amplitude de variação alélica encontrada para os locos (Tabela 3.1). As amplitudes observadas não são proporcionais aos tamanhos dos motivos como se espera no modelo mutacional mais frequente para microssatélites que é dado pela inserção ou deleção de motivos inteiros. No entanto, existem muitos modelos de mutação para os microssatélites (Ellegren, 2004) e a variação diferente do esperado em função do tamanho, tem sido observada em locos microssatélites de alguns organismos (Van Oppen et al., 2000).



**Figura 3.3.** Escadas alélicas para a confirmação da altura dos alelos de dois locos microssatélites (Da\_E06 e Da\_E12) desenvolvidos para a espécie *Dipteryx alata*, analisados em gel de poliacrilameida 6%, corado com nitrato de prata. As colunas das extremidades de cada foto são os marcadores de massa molecular (10 pares de bases, da Invitrogen®).

Para o loco Da\_E06 foi estimado um valor de  $H_e$  igual a 0,2946 e de  $H_o$  0,1613. O loco Da\_E12 apresentou valores similares, ligeiramente menores, iguais a 0,2879 e 0,1429 para  $H_e$  e  $H_o$ , respectivamente. As frequências de alelos nulos foram igualmente similares entre os dois locos, para as quais as estimativas foram iguais a 0,103 e 0,113, respectivamente para Da\_E06 e Da\_E12. As estimativas de probabilidade de exclusão de paternidade e probabilidade de identidade para os locos foram de 0,255 e 0,0357, respectivamente (Tabela 3.1), o que indica uma baixa capacidade de discriminação individual. No entanto, os valores de  $H_e$  são satisfatórios considerando o número de alelos dos locos o que indica que eles são adequados para estudos populacionais.

### 3.4 CONCLUSÃO

Os iniciadores desenhados foram sintetizados e padronizados satisfatoriamente. Entretanto, foram encontrados poucos alelos e um baixo polimorfismo, provavelmente devido ao tamanho dos motivos destes locos, gerando a necessidade de desenvolvimento de novos iniciadores para uma melhor cobertura do genoma e detecção de variabilidade genética em *D. alata*. Em função do baixo rendimento de locos polimórficos, foram desenvolvidos mais 62 iniciadores (Apêndice A), que ainda deverão ser testados, com o intuito de dar continuidade ao trabalho de busca de um maior número de marcadores informativos para a espécie *D. alata*.

#### 4 ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO VIA PÓLEN E SEMENTE ENTRE SUBPOPULAÇÕES DE *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE)

##### RESUMO

A quantificação da composição, padrões de estrutura e distribuição da variabilidade genética nas populações naturais de plantas do Cerrado é importante para se inferir a atuação dos processos microevolutivos nestas espécies. *Dipteryx alata* Vogel é uma espécie amplamente distribuída no bioma Cerrado e que tem chamado muita atenção devido às suas amplas possibilidades de exploração. O objetivo deste trabalho foi avaliar a magnitude e a distribuição espacial da variabilidade genética biparental e uniparental (cloroplastidial), assim como a contribuição relativa de cada uma delas para o fluxo gênico em subpopulações naturais de *D. alata*. Foram utilizadas 23 subpopulações georeferenciadas, totalizando 775 plantas, para a análise molecular com base em três locos microssatélites genômicos e dois locos microssatélites cloroplastidiais. Foi observado que as subpopulações de *D. alata* apresentam consideráveis níveis de variabilidade genética que se encontra significativamente estruturada entre as subpopulações, tanto para os dados genômicos quanto para os cloroplastidiais, apresentando-se também estruturada no espaço. A estimativa da taxa de fecundação cruzada aparente ( $t_a = 1,0575$ ) indica que a espécie seja alógama. As estimativas das razões de migração via pólen e via semente foram menores do que 1, o que indica que a dispersão de sementes contribui mais efetivamente para o fluxo gênico total.

*Palavras-chave:* autocorrelação espacial; baru, cpDNA, microssatélite.

##### ABSTRACT

GENETIC STRUCTURE AND POLLEN-SEED GENE FLOW AMONG SUBPOPULATIONS OF *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE)



The quantification of composition, structure patterns and distribution of genetic variability in natural populations of Cerrado are important to infer the performance of micro-evolutionary procedures in *Dipteryx alata* Vogel. This is a species widely distributed in the Cerrado biome and has great potential to be explored. The goal of this study was to evaluate the magnitude and the spatial distribution of biparental and uniparental (chloroplastidial) genetic variability, and also their relative contribution for gene flow in natural subpopulations of *D. alata*. 23 georeferenced subpopulations, totalizing 775 plants, were used for molecular analyses based on three genomic and two chloroplastidial microsatellite loci. *D. alata* subpopulations showed high levels of genetic variability that was significantly structured among subpopulations and in space, both for genomic and chloroplastidial data. The estimation of the apparent cross-fertilization rate ( $t_a = 1.0575$ ) indicates that the species is allogamous. Estimations of migration rates by pollen and by seeds were lower than 1.0, indicating that seed dispersal contributes more effectively for total gene flow.

*Key words:* “baru” tree, cpDNA, microsatellite, spatial autocorrelation.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado abriga uma grande riqueza florística, o que classifica sua flora como a mais diversificada entre as savanas mundiais (Mendonça et al., 1998). Esta riqueza está relacionada com a sua grande variedade de paisagens e tipos fitofisionômicos, além de sua posição geográfica, que permite amplo contato e intercâmbio florístico com outros biomas (Sano et al., 2008).

A flora do Cerrado tem em sua composição muitas plantas que apresentam potencial de utilização, dentre as quais as espécies frutíferas ocupam um lugar de destaque por serem muito apreciadas pela comunidade da região (Almeida, 1998). O barueiro (*Dipteryx alata* Vogel) tem sido utilizado pela população regional como fonte complementar de renda familiar, pela exploração extrativista de seu fruto, o baru (Ribeiro et al., 2000; Sano et al., 2004). O uso racional e a conservação dos recursos naturais podem ser muito auxiliados pelo aumento do conhecimento científico sobre a biologia das espécies de interesse (Venkovsky et al., 2007). Neste contexto, o conhecimento sobre o

componente genético da diversidade de uma espécie permite avaliar o seu potencial evolutivo frente às mudanças ambientais (Frankham et al., 2008), além de fornecer a base para o manejo e a exploração racional.

A estrutura genética em populações de plantas é determinada pela combinação dos movimentos dos alelos via pólen e via semente entre as subpopulações. A contribuição destas duas formas de dispersão genética na estruturação da variabilidade genética encontrada nas populações naturais pode ser estimada com base na combinação de marcadores moleculares genômicos e cloroplastidiais. Tais estudos fornecem informações importantes sobre o padrão de fluxo gênico e as estratégias de colonização de áreas naturais das espécies (Petit et al., 2005; Martins et al., 2006; Wang et al., 2008). A quantificação dos padrões espaciais de fluxo gênico em metapopulações é importante, pois contribui para a sugestão de estratégias de conservação (Heywood, 1991; Fenster et al., 2003).

Dentre as várias classes de marcadores moleculares utilizados nos estudos genético-populacionais, os microssatélites são considerados uma excelente ferramenta, por serem altamente informativos para os estudos intraespecíficos (Brondani et al., 1998; Ellegren, 2004; Selkoe & Toonen, 2006). O desenvolvimento de iniciadores universais para a amplificação e análise de regiões microssatélites cloroplastidiais para angiospermas dicotiledôneas abriu uma ampla perspectiva de aplicação desta técnica de modo rápido e com custo relativamente pequeno para muitas espécies de plantas (Weising & Gardner, 1999; Provan et al., 2001; Azevedo et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a magnitude e a distribuição espacial da variabilidade genética biparental e uniparental (cloroplastidial), assim como a contribuição relativa de cada uma delas para o fluxo gênico em subpopulações naturais de *Dipteryx alata* Vogel.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do material para o presente estudo foi realizada com o intuito de amostrar as subpopulações de modo a incluir a maior área possível dentro da distribuição natural da espécie. Desta maneira, foram coletadas 23 subpopulações que compreendem os Estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São

Paulo. A localização e a distância geográfica entre as subpopulações foram determinadas, utilizando o programa DIVA-GIS versão 5.2 (Hijmans et al., 2005), a partir das coordenadas geográficas e a altitude (m) pelo Sistema de Posicionamento Global – GPS (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1.** Local de coleta, código da subpopulação (Cód.), coordenadas geográficas (longitude e latitude) e altitude (m) de 23 subpopulações de barueiro (*Dipteryx alata*).

Local de coleta	Cód.	Longitude	Latitude	Altitude (m)
Água Boa-MT	ABMT	-52,04200	-13,83900	315
Arinos-MG	AMG	-46,27300	-15,93400	553
Alcinópolis-MS	AMS	-53,92600	-18,26800	387
Arraias-TO	ARTO	-46,86329	-12,99037	567
Alvorada-TO	ATO	-49,11500	-12,44900	301
Camapuã-MS	CMS	-53,90000	-19,52800	605
Cocalinho-MT	CMT	-50,99600	-14,39700	241
Estrela do Norte-GO	ENGO	-49,14000	-13,82800	398
Indiara-GO	IGO	-49,97300	-17,16200	585
Icém-SP	ISP	-49,21600	-20,34700	469
Jandaia-GO	JGO	-50,20137	-16,91208	611
Luziânia-GO	LGO	-48,13000	-16,73200	808
Monte Alegre de Minas-MG	MAMG	-49,02400	-18,97800	696
Natividade-TO	NTO	-47,71377	-11,66140	341
Paraíso/Camapuã-MS	PCMS	-53,37700	-19,33000	583
Pirenópolis-GO	PGO	-49,03400	-15,99700	756
Pintópolis-MG	PMG	-45,16643	-16,06100	490
Paraíso-MS	PMS	-52,98200	-18,84579	637
Rio Araguaia-GO	RAGO	-52,15839	-15,94821	324
Rio Araguaia-MT	RAMT	-52,18708	-15,91171	350
São Miguel do Araguaia-GO	SMGO	-50,10300	-13,22500	342
Sonora-MS	SMS	-54,70400	-17,85300	454
Santa Terezinha de Goiás-GO	STGO	-49,62800	-14,52000	404

Foram coletadas folhas das plantas de cada subpopulação e depositadas em sacos de papel pardo, identificados com o número da planta e sua subpopulação de origem. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo, para o transporte até o laboratório. O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética & Biodiversidade, da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, GO. A extração do DNA

total foi realizada a partir de tecido foliar, conforme o protocolo de extração de DNA descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). Após a extração, o DNA foi quantificado e diluído para a concentração de trabalho de aproximadamente  $2,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

Foram utilizados três pares de iniciadores de microssatélites genômicos, dois (Da\_E06 e Da\_E12) desenvolvidos e padronizados para a espécie *D. alata* (Soares et al., dados ainda não publicados) e um (BM164) desenvolvido para *Phaseolus vulgaris* e transferido para *D. alata* (Garcia et al., 2007). Também foram utilizados iniciadores de regiões microssatélites cloroplastidiais desenvolvidos originalmente para angiospermas dicotiledôneas (Weising & Gardner, 1999) e transferidos para *D. alata*. A padronização destes locos foi feita inicialmente testando-se todos os dez iniciadores de Weising & Gardner (1999), com quatro indivíduos de *D. alata*, quanto ao padrão de amplificação e especificidade do loco. Após o ajuste das condições de amplificação uma amostra, composta por 63 indivíduos, provenientes de 21 subpopulações contendo três plantas cada foi utilizada para a avaliação do polimorfismo dos locos.

As reações PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a amplificação dos locos foram realizadas a partir de um coquetel com volume final de  $15 \mu\text{L}$ , utilizando  $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de DNA e 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda). O programa de amplificação no termociclador possui os seguintes passos: (1°) Desnaturação do DNA a  $94^\circ\text{C}$  por 5 minutos; (2°)  $94^\circ\text{C}$  por 1 minuto; (3°) temperatura específica de anelamento do iniciador por 1 minuto; (4°) Extensão da molécula pela enzima *Taq* DNA polimerase a  $72^\circ\text{C}$  por 1 minuto (Tabela 5.6); (5°) 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passo; (6°) Passo final de extensão de 7 minutos a  $72^\circ\text{C}$  para finalizar os produtos amplificados.

Após a amplificação, os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida na concentração de 6%, em corrida de eletroforese vertical, utilizando tampão TBE 1X, por um tempo que variou entre uma hora e meia a duas horas e meia. A coloração foi realizada segundo o protocolo de Creste et al. (2001) e após a secagem das placas o tamanho de cada alelo foi determinado por comparação com marcador de peso molecular padrão 10 pb (Invitrogen®). A confirmação da existência de todos os alelos foi realizada por meio de uma escada alélica, obtida com base na codificação de uma nova eletroforese dos produtos amplificados arranjados na sequência crescente de tamanho.

Os parâmetros genéticos de diversidade para os locos e para as subpopulações foram obtidos pelo programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001), tanto para os microssatélites genômicos quanto para os cloroplastidiais. Foram estimados: a porcentagem de locos polimórficos ( $P$ ); o número médio de alelos por loco ( $A$ ); o número médio de alelos por loco polimórfico ( $Ap$ ); a heterozigosidade esperada sob condições do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ) e a heterozigosidade observada ( $H_o$ ). O índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ) foi calculado por população e para o conjunto delas utilizando o programa Arlequin versão 3.11 (Excoffier et al., 2005). Os parâmetros  $H_o$  e  $f$  não foram estimados para os dados cloroplastidiais.

Para os microssatélites genômicos, também foi estimada a heterozigosidade máxima ( $h_{máx}$ ) possível, em relação ao número de alelos observados, obtido pela fórmula ( $h_{máx} = (A-1)/A$ ), bem como a razão  $h_{máx}/H_e$ . A taxa de fecundação cruzada aparente foi estimada de acordo com a relação entre os valores do índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), assumindo-se que as subpopulações estão em equilíbrio de Wright, conforme sugerido

por Fyfe & Bailey (1951), citados por Coelho (2002), em que  $\hat{t}_a = \frac{1 - \hat{f}}{1 + \hat{f}}$ .

Para os microssatélites cloroplastidiais também foram estimadas as frequências haplotípicas para as subpopulações e para o conjunto delas, utilizando o programa Arlequin versão 3.11 (Excoffier et al., 2005). Neste programa a diversidade gênica

(haplotípica) é calculada da seguinte maneira:  $H = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$ , em que  $n$  é o número de genes na amostra;  $k$  é o número de haplótipos e  $p_i$  é a frequência do  $i$ ésimo haplótipo. Para a visualização das frequências dos haplótipos foi construído um mapa, com base nas coordenadas geográficas das subpopulações utilizando o programa DIVA-GIS versão 5.2 (Hijmans, et al., 2005), contendo as frequências haplotípicas representadas em gráfico.

As análises de estrutura genética entre subpopulações, utilizando os marcadores genômicos e cloroplastidiais, foram realizadas no programa SPAGeDi versão 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002). Para a análise de estrutura genética populacional foram estimados os seguintes índices (Hardy & Vekemans, 2002): 1) As estatísticas  $F$  que incluem o coeficiente de correlação intra-classe dos alelos (identidade por estado) para genes dentro de indivíduos, com relação a população total ( $F_{IT}$ ); o coeficiente de correlação de genes dentro de indivíduos, considerando uma subpopulação ( $F_{IS}$ ); e o coeficiente de

correlação de genes dentro de subpopulações com relação à população total ( $F_{ST}$ ) (Weir & Cockerham 1984); 2)  $G_{ST}$ , equivalente ao  $F_{ST}$ , é baseado na decomposição dos índices de diversidade genética e considera, diferentemente do  $F_{ST}$ , que as subpopulações têm pesos iguais, independente do tamanho amostral de cada uma (Pons & Petit 1996); e 3)  $N_{ST}$ , análogo ao  $F_{ST}$ , mas leva em consideração a distância entre os alelos de cada loco (“alelos ordenados”) na estimativa da estrutura genética populacional (Pons & Petit 1996).

A divergência genética entre as subpopulações foi avaliada com base na estimativa par a par do índice  $N_{ST}$  e na estimativa da distância de Nei 1978. As matrizes de distâncias genéticas resultantes foram comparadas entre si e com a matriz de distância geográfica entre as subpopulações, com base no teste de Mantel, utilizando o pacote NTSYS versão 2.02 (*numerical taxonomy and multivariate analysis system*) (Rohlf, 1989).

Para a representação gráfica do padrão de divergência genética entre as subpopulações foi realizada uma análise de agrupamento com base no critério UPGMA (*unweighted pair-group method by arithmetic averages*) que produz um arranjo hierárquico de classificação das subpopulações, representado por um dendrograma. A representatividade deste dendrograma foi testada por meio da correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias entre as subpopulações no dendrograma (correlação cofenética). Estas análises também foram realizadas no pacote NTSYS versão 2.02 (Rohlf, 1989).

A razão de migração via pólen e semente ( $r = m_p/m_s$ ) foi estimada conforme as equações (Ennos, 1994; Petit et al., 2005):

$$r = \frac{m_p}{m_s} = \frac{\left[ \left( \frac{1}{G_{STn}} - 1 \right) (1 + F_{IS}) - 2 \left( \frac{1}{G_{STcp}} - 1 \right) \right]}{\left( \frac{1}{G_{STcp}} - 1 \right)}$$

em que,  $G_{STn}$  e  $G_{STcp}$  correspondem às estimativas de diferenciação entre subpopulações com base nos dados genômicos e cloroplastidiais, respectivamente e  $F_{IS}$  é o índice de fixação intrapopulacional que estima o déficit de heterozigotos nas subpopulações e que, em populações exogâmicas, pode ser considerado igual a zero.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três locos microssatélites genômicos, BM164, DaE-06 e DaE-12, apresentaram respectivamente oito, quatro e cinco alelos (Tabela 4.2). Os alelos 156, 170 e 174 do loco BM164 são privados, respectivamente, às subpopulações SMS, CMT e ABMT e o alelo 212 do loco Da\_E-06 é privado à AMS. Os valores de diversidade genética esperada e observada foram semelhantes e compatíveis com o número de alelos, com um valor médio, incluindo os três locos, igual a 0,238 e 0,202 para as diversidades esperada e observada, respectivamente (Tabela 4.2).

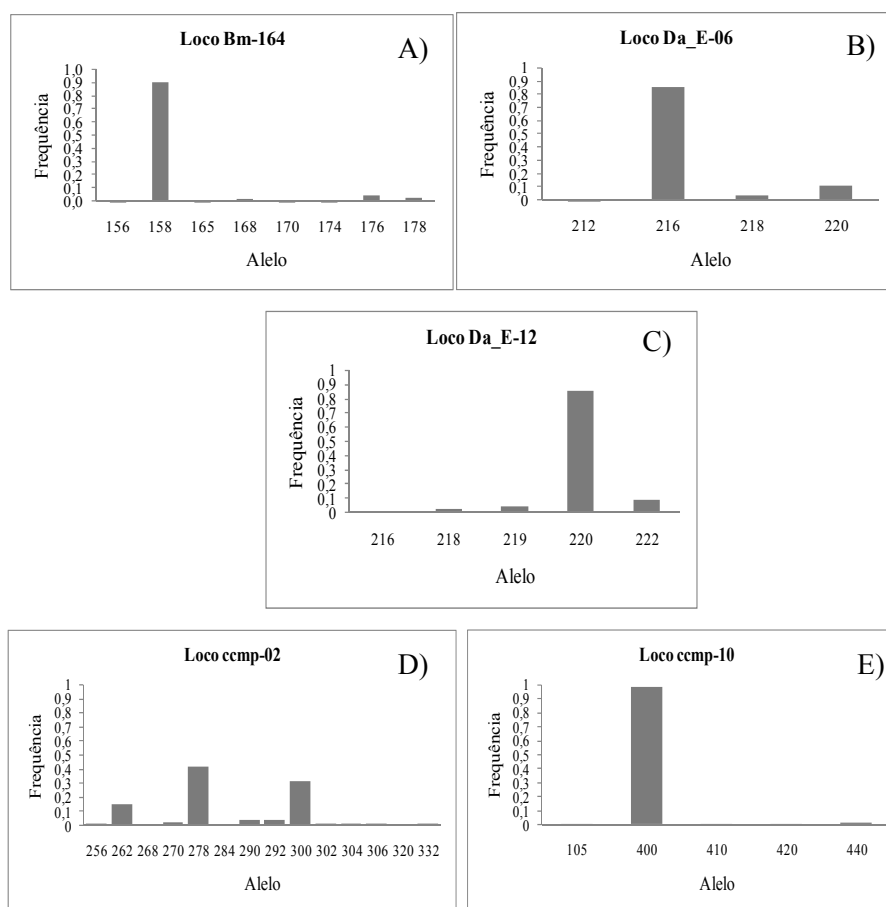
**Tabela 4.2.** Parâmetros de diversidade genética para locos microssatélites genômicos (SSRg) e cloroplastidiais (SSRcp) analisados em 23 subpopulações de *Dipteryx alata*.

SSRg	Sequência dos iniciadores 5'-3'	Motivo	Ta(°C)	A	Amplitude (pb)	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	f
BM164	CCACCACAAGGAGAAGCAAC ACCATTCAGGCCGATACTCC	(GT) <sub>9</sub> (GA) <sub>21</sub> <sup>1</sup>	56	8,0	156-178	0,181	0,150	0,168
Da_E-06	TGCAGCATAAAAATTGCGAA TTACCCCAAAGCCTCAAGAA	(AAAT) <sub>17</sub>	60	4,0	212-220	0,266	0,207	0,221
Da_E-12	CCTTCTATGCGCTCTCTGCT TACTTCAACGCCAGCTTCCT	(ATTTT) <sub>18</sub>	64	5,0	216-222	0,266	0,247	0,070
Média				5,7	-	0,238	0,202	0,151
<b>SSRcp</b>								
ccmp02	GATCCCGGACGTAATCCTG ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	(A) <sub>11</sub> <sup>2</sup>	56	14	256-332	0,712	-	-
ccmp10	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	(T) <sub>14</sub> <sup>2</sup>	56	5	105-440	0,033	-	-
Média				9,5		0,372	-	-

<sup>1</sup>Motivo observado na espécie *Phaseolus vulgaris*. <sup>2</sup>Motivo observado na espécie *Nicotiana tabacum*.

O loco BM164 apresentou oito alelos (Figura 4.1), próximo ao observado para *Phaseolus vulgaris* com onze e doze alelos em alguns trabalhos (Gaitán-Solís et al., 2002; Blair et al., 2006), com uma predominância do alelo 158 (0,9 de frequência). Os locos Da\_E-06 e Da\_E-12 apresentaram uma quantidade de alelos relativamente baixa, considerando o esperado para locos microssatélites que são multialélicos por definição (Brondani et al., 1998; Goldstein & Schlötterer, 2001; Ellegren, 2004). Entretanto, esta quantidade de alelos é esperada para regiões microssatélites que apresentam motivos de

repetição com mais de quatro bases (Ellegren, 2004), como no caso destes locos que são tetra e hexanucleotídeo, respectivamente. A amplitude alélica destes locos também foi menor do que o esperado para o tamanho dos seus motivos, no entanto têm sido verificados muitos modelos mutacionais diferentes da inserção ou deleção de motivos em locos microssatélites de alguns organismos (van Oppen et al., 2000; Ellegren, 2004). Estes dois locos apresentaram um alelo mais frequente (acima de 80%) (Figura 4.1), o que também pode estar relacionado com o fato de serem polinucleotídeos.



**Figura 4.1.** Frequências alélicas provenientes da análise de três locos microssatélites genômicos, BM164 (A), Da\_E06 (B) e Da\_E12 (C) e de dois locos microssatélites cloroplastidiais ccmp02 (D) e ccmp10 (E), em 23 subpopulações naturais de barueiro (*Dipteryx alata*).

Para os locos cloroplastidiais, dois (ccmp02 e ccmp10) dos dez testados apresentaram polimorfismo, para os quais foram observados quatorze (ccmp-02) e cinco (ccmp-10) alelos para cada um deles (Tabela 4.2). Os alelos 284 e 332 foram privados à



subpopulação SMS e o alelo 268 à PGO, para o loco ccmp-02. Para o loco ccmp-10, o alelos 105 e 440 foram privados à subpopulação SMS e o alelo 410 à AMS. A diversidade genética foi igual a 0,033 para o loco ccmp-10 e 0,712 para o loco ccmp-02 (Tabela 4.2), bem singulares quando considerado cada um dos locos. Esse padrão pode ser explicado tanto pela diferença do número de alelos entre eles, quanto pelo fato da existência de um alelo com alta frequência (acima de 0,95) no loco ccmp-10 (Figura 4.1), o que modifica a equidistribuição dos alelos dentro das subpopulações e, conseqüentemente, a diversidade genética.

Os valores de diversidade nas subpopulações variaram entre 0,0244 e 0,5311 para os locos microssatélites genômicos e entre 0,0547 e 0,5954 para os locos cloroplastidiais (Tabela 4.3). Embora exista uma correlação significativa ( $r = 0,4387$ ;  $P = 0,0362$ ), entre as estimativas de diversidade dos dados de marcadores microssatélites genômicos e cloroplastidiais, as inferências sobre os processos microevolutivos atuando sobre as mesmas devem ser diferenciadas, uma vez que as regiões genômicas apresentam modos de herança e taxa de evolução diferentes (Petit et al., 2005; Selkoe & Toonen, 2006).

Para os dados de microssatélites genômicos verificou-se que as subpopulações apresentam valores de  $H_e$  que correspondem, em média, a cerca de 40% do  $h_{max}$  (Tabela 4.3), o que sugere que existe uma considerável diversidade genética, ponderando o número de alelos. Entretanto, esses valores são baixos quando comparados aos encontrados para outras espécies nativas do Cerrado (Collevatti et al., 2001; Zucchi et al., 2003).

As estimativas do índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ) e das taxas aparentes de fecundação cruzada ( $t_a$ ) sugerem que as subpopulações de *D. alata* são, em maioria, exogâmicas (Tabela 4.4). Foram detectadas algumas exceções nas quais são observados valores significativos de  $f$  acima de 0,2. Tais valores não parecem estar relacionados com o tamanho populacional, pois a correlação entre o  $n$  e  $f$  não apresentou significância ( $r = 0,0925$ ;  $p = 0,6748$ ). Sendo assim, uma das explicações plausíveis seria o fato de que estas subpopulações estão em locais com alto impacto humano, uma vez que as subpopulações ATO e SMGO estão em áreas tipicamente de pastagem intensiva e ISP em área bastante fragmentada (detalhes sobre esta subpopulação pode ser vistos em Soares et al. 2008b).

O valor geral da taxa aparente de fecundação cruzada ( $t_a = 1,0575$ ), estimado com base no valor médio de  $f$  (-0,0279), indica que a espécie *D. alata* seja alógama. Este resultado corrobora a hipótese de que *D. alata* seja preferencialmente alógama sugerida

com base na análise de dados morfológicos (Siqueira et al., 1993) e com base no padrão de diferenciação entre subpopulações avaliadas com marcadores dominantes (Soares, 2006).

**Tabela 4.3.** Parâmetros de diversidade genética populacional estimados com base em locos microssatélites genômicos (SSRg) e cloroplastidiais (SSRcp) para 23 subpopulações de *Dipteryx alata*.

Subpop.	SSRg								SSRcp					
	<i>n</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>Ap</i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>h<sub>máx</sub></i>	<i>H<sub>e</sub>/h<sub>máx</sub></i>	<i>n</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>Nh</i>	<i>H</i>
ABMT	35	0,7	2,0	2,5	0,150	0,190	0,500	0,300	35	0,5	3,0	0,281	5	0,570
AMG	33	0,3	1,3	2,0	0,147	0,211	0,250	0,587	34	0,5	1,5	0,058	2	0,117
AMS	35	1,0	4,3	4,3	0,431	0,429	0,769	0,561	35	1,0	4,0	0,495	8	0,503
ARTO	15	0,7	1,7	2,0	0,084	0,089	0,400	0,211	15	0,5	3,0	0,372	5	0,771
ATO	35	1,0	2,3	2,3	0,251	0,190	0,571	0,439	35	0,5	2,0	0,192	3	0,390
CMS	13	1,0	2,7	2,7	0,531	0,600	0,625	0,850	13	1,0	2,5	0,363	4	0,378
CMT	34	1,0	2,3	2,3	0,147	0,137	0,571	0,257	34	0,5	3,0	0,297	5	0,604
ENGO	12	0,7	2,0	2,5	0,228	0,202	0,500	0,456	12	0,5	1,5	0,080	2	0,167
IGO	13	0,7	2,0	2,5	0,234	0,312	0,500	0,467	13	0,5	2,0	0,308	3	0,641
ISP	34	1,0	2,3	2,3	0,397	0,304	0,571	0,694	35	0,5	2,5	0,196	4	0,398
JGO	34	0,3	1,7	3,0	0,166	0,196	0,400	0,414	34	0,5	2,0	0,267	3	0,542
LGO	35	0,3	1,3	2,0	0,068	0,076	0,250	0,274	35	0,5	1,5	0,055	2	0,111
MAMG	34	1,0	3,0	3,0	0,446	0,503	0,667	0,669	35	0,5	2,0	0,228	3	0,462
NTO	13	0,3	1,3	2,0	0,026	0,026	0,250	0,103	13	0,5	2,0	0,289	3	0,603
PCMS	12	1,0	2,7	2,7	0,320	0,240	0,625	0,512	13	0,5	3,0	0,302	5	0,628
PGO	40	0,3	1,3	2,0	0,024	0,025	0,250	0,097	40	0,5	2,0	0,173	3	0,351
PMG	36	0,7	1,7	2,0	0,078	0,085	0,400	0,194	36	0,5	2,5	0,080	4	0,162
PMS	13	1,0	3,0	3,0	0,288	0,312	0,667	0,432	13	0,5	2,5	0,345	4	0,718
RAGO	105	0,7	2,7	3,0	0,121	0,127	0,625	0,193	105	0,5	2,5	0,296	4	0,595
RAMT	105	0,7	2,3	2,5	0,151	0,137	0,571	0,265	105	0,5	3,0	0,341	5	0,686
SMGO	36	1,0	2,0	2,0	0,234	0,185	0,500	0,469	36	0,5	2,0	0,243	3	0,494
SMS	34	1,0	3,0	3,0	0,377	0,451	0,667	0,565	35	1,0	6,5	0,595	11	0,604
STGO	12	0,7	2,0	2,5	0,177	0,172	0,500	0,355	12	0,5	1,5	0,145	2	0,303
Média	33	0,7	2,2	2,5	0,221	0,226	-	0,407	34	0,6	2,5	0,261	4,0	0,373

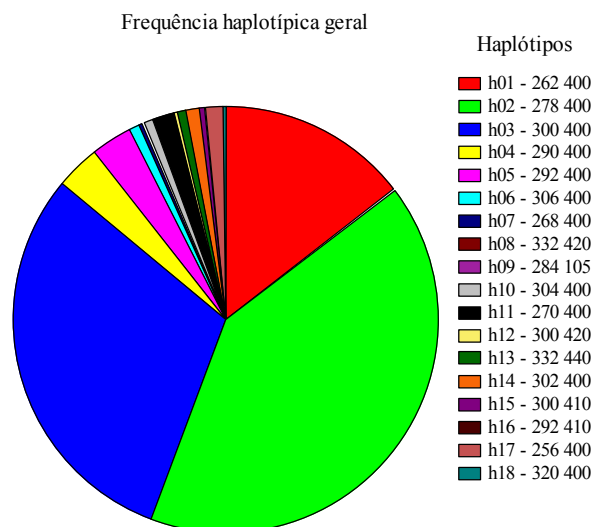
*n*, número de plantas analisadas; *P*, porcentagem de locos polimórficos; *A*, número médio de alelos; *Ap*, número médio de alelos por loco polimórfico; *H<sub>e</sub>*, heterozigosidade esperada; *H<sub>o</sub>*, heterozigosidade observada; *h<sub>máx</sub>*, heterozigosidade máxima esperada; *H<sub>e</sub>/h<sub>máx</sub>*, razão entre heterozigosidade esperada e heterozigosidade máxima esperada; *Nh*, número de haplótipos; *H*, diversidade haplotípica.

**Tabela 4.4.** Estimativas, com base em três locos microssatélites genômicos, do índice de fixação intrapopulacional  $\hat{f}$ , com seus respectivos valores de significância P, e taxa de fecundação cruzada aparente  $\hat{t}_a$  para 23 subpopulações de *Dipteryx alata*.  $n$  se refere ao número de plantas analisadas e em negrito estão os valores significativos de  $\hat{f}$ .

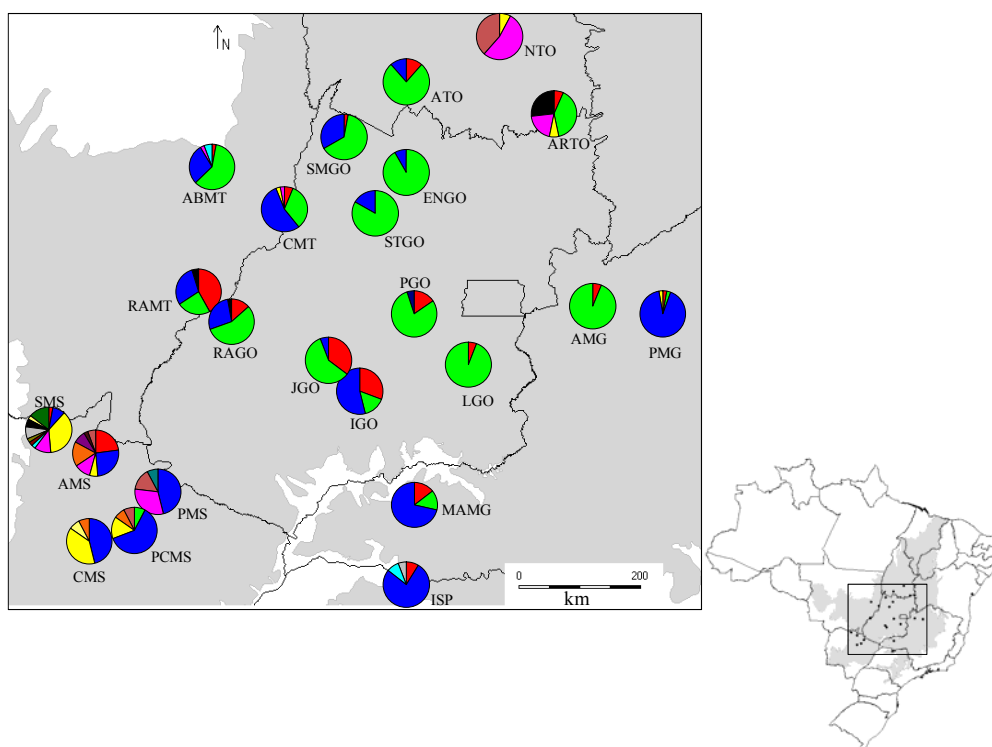
Subpop.	$n$	$\hat{f}$	P	$\hat{t}_a$
ABMT	35	-0,2758	1,000	1,7617
AMG	33	-0,7000	1,000	5,6667
AMS	35	0,0065	0,387	0,9871
ARTO	15	-0,0566	1,000	1,1200
ATO	35	<b>0,2428</b>	0,011	0,6093
CMS	13	-0,1548	0,891	1,3663
CMT	34	0,0461	0,419	0,9119
ENGO	12	0,0610	0,239	0,8850
IGO	13	-0,3846	1,000	2,2500
ISP	34	<b>0,2366</b>	0,005	0,6174
JGO	34	-0,1871	0,887	1,4602
LGO	35	-0,1148	0,356	1,2592
MAMG	34	-0,1552	0,971	1,3674
NTO	13	0,0000	1,000	1,0000
PCMS	12	0,2117	0,122	0,6506
PGO	40	<b>-0,0263</b>	0,044	1,0541
PMG	36	-0,1290	1,000	1,2963
PMS	13	-0,1035	0,817	1,2308
RAGO	105	-0,0526	0,831	1,1111
RAMT	105	0,0898	0,115	0,8353
SMGO	36	<b>0,2126</b>	0,012	0,6493
SMS	34	-0,2000	0,980	1,5000
STGO	12	0,0075	0,499	0,9851
Média	33	-0,0279	0,863	1,0575

Nos locos cloroplastidiais foram observados dezoito haplótipos, considerando todas as subpopulações, variando entre dois e 11 alelos por subpopulação (Tabela 4.3). A diversidade haplotípica variou entre 0,111 (LGO) e 0,771 (ARTO) e a média geral foi de 0,373 (Tabela 4.3). Na Figura 4.2 observa-se que h02 foi o haplótipo mais frequente, seguido do h03 e h01, respectivamente. É importante ressaltar que pelo menos um destes três haplótipos está presente em praticamente todas as subpopulações, exceto na subpopulação NTO que exibiu composição bem diferenciada (Figura 4.3). As

subpopulações ao norte e ao sul no mapa têm composição haplotípica bastante diferentes das do centro, que por sua vez são pouco diversificadas (Figura 4.3).



**Figura 4.2.** Frequências haplotípicas provenientes da análise de dois locos microssatélites cloroplastidiais em 23 subpopulações naturais de barueiro (*Dipteryx alata*).



**Figura 4.3.** Frequências de haplótipos de locos microssatélites cloroplastidiais em 23 subpopulações naturais de barueiro (*Dipteryx alata*). Em cinza está delimitada a área contínua do bioma Cerrado e os pontos pretos no mapa do Brasil (abaixo) são os locais de coleta.

Algumas teorias predizem que o centro de origem de uma espécie seja a região com maior diversidade genética (Sagarin & Gaines, 2002). As subpopulações ARTO e PMS apresentam os maiores valores de diversidade haplotípica (Tabela 4.3), assim, sob este modelo poderia se hipotetizar que a espécie *D. alata* teria pelo menos duas regiões de origem das linhagens maternas, uma ao nordeste e outra ao sudoeste do bioma Cerrado e depois ela foi se expandindo para o centro. O padrão de múltiplas origens maternas foi observada para outra espécie do Cerrado, a *Caryocar brasiliense*, (Collevatti et al., 2003), entretanto, para confirmar esta hipótese para *D. alata* seria necessário incluir um grupo externo, ou seja uma outra espécie, nesta análise, o que possibilitaria verificar melhor os padrões de diferenciação.

A análise de estrutura genética populacional, com base nos locos microssatélites genômicos, apresentou valores bastante semelhantes entre as estimativas de  $F_{ST}$  e  $G_{ST}$  (Tabela 4.5), o que indica que a magnitude de variação entre as subpopulações de *D. alata* é de cerca de 0,18, logo aproximadamente 0,82 da variação total se refere ao componente intrapopulacional. A endogamia total ( $F_{IT}$ ) foi igual a 0,1611 e, como o valor do índice de fixação intrapopulacional estimado ( $f = -0,0279$ ) indica ausência de endogamia intrapopulacional, este valor de  $F_{IT}$  deve ocorrer apenas em função do efeito de subdivisão e não como resultado do sistema reprodutivo.

**Tabela 4.5.** Estimativas da endogamia total ( $F_{IT}$ ), do índice de fixação intrapopulacional e de diferentes índices de subdivisão populacional, com base em marcadores microssatélites genômicos (SSRg) e cloroplastidiais (SSRcp), e razão de migração via pólen e via semente ( $r = m_p/m_s$ ) entre 23 subpopulações de *Dipteryx alata*.

Índice	SSRg	SSRcp	$r = m_p/m_s$
$F_{IT}$	0,1611	-	-
$f$	-0,0279	-	-
$F_{ST}$	0,1740	0,2820	-0,1355
$G_{ST}$	0,1776	0,3165	0,1300
$N_{ST}$	0,2206	0,2944	-0,5259

Os valores de estrutura genética entre as subpopulações deste estudo estão bem próximos ao estimado com base em marcadores RAPD ( $\Phi_{ST} = 0,155$  e  $\theta^B = 0,161$ ), para

dez das 23 subpopulações deste estudo (Soares et al., 2008a). Apesar das diferentes regiões genômicas avaliadas pelos marcadores microssatélites e RAPD, esses resultados semelhantes sugerem que, para a espécie *D. alata*, foi possível capturar o mesmo padrão de estruturação genética, provavelmente em função da intensidade dos processos microevolutivos que estão atuando na mesma direção nas subpopulações estudadas.

Ainda com base nos locos microssatélites genômicos a estimativa do índice  $N_{ST}$  foi um pouco maior, com valor igual a 0,2206 (Tabela 4.5). De fato, Petit et al. (2005) observaram nos dados que compilaram que em 71% deles o  $N_{ST}$  foi maior do que o  $G_{ST}$ . No entanto, o teste para verificar se a distância entre os alelos é informativa no valor global do  $N_{ST}$  não foi significativo ( $p = 0,3813$ ), indicando que a taxa de mutação dos locos estudados não interfere significativamente na estruturação da variabilidade genética entre subpopulações (Pons & Petit, 1996, Petit et al., 2005). A diferença entre  $N_{ST}$  pode ser causada por vários fatores, incluindo artefatos de amostragem, efeito desigual das taxas de mutação e estrutura filogeográfica (Pons & Petit, 1996). O  $N_{ST}$  tende a ser maior quando os pares de alelos mais divergentes estão entre subpopulações e menor quando estão dentro delas (Lynch & Crease, 1990, citados por Pons & Petit, 1996), sendo assim, para os dados de microssatélites genômicos, parece que a maior parte dos alelos divergentes está dentro das subpopulações.

Nesse estudo a diferença entre os valores estimados para  $F_{ST}$  e  $G_{ST}$  com relação ao  $N_{ST}$  foi bem menor do que o observado para a espécie *Caryocar brasiliense*, para a qual foram encontrados valores iguais a 0,07 e 0,29 para os índices  $\theta$  e  $R_{ST}$ , respectivamente (Collevatti et al., 2001). Semelhantemente a este estudo, as estimativas de  $F_{ST}$  e  $N_{ST}$ , para a espécie *Eugenia dysenterica*, apresentaram valores bem próximos, iguais a 0,250 e 0,269, respectivamente (Zucchi et al., 2003).

Para os locos cloroplastidiais os valores estimados para  $F_{ST}$ ,  $G_{ST}$  e  $N_{ST}$  foram, de modo geral, mais elevados variando entre 0,28 e 0,32 (Tabela 4.5). Esses valores mais elevados eram previstos, uma vez que se espera um tamanho efetivo menor e um aumento na estruturação, quando se considera o modo de evolução do genoma do cloroplasto, que é herdado uniparentalmente (Petit et al., 2005).

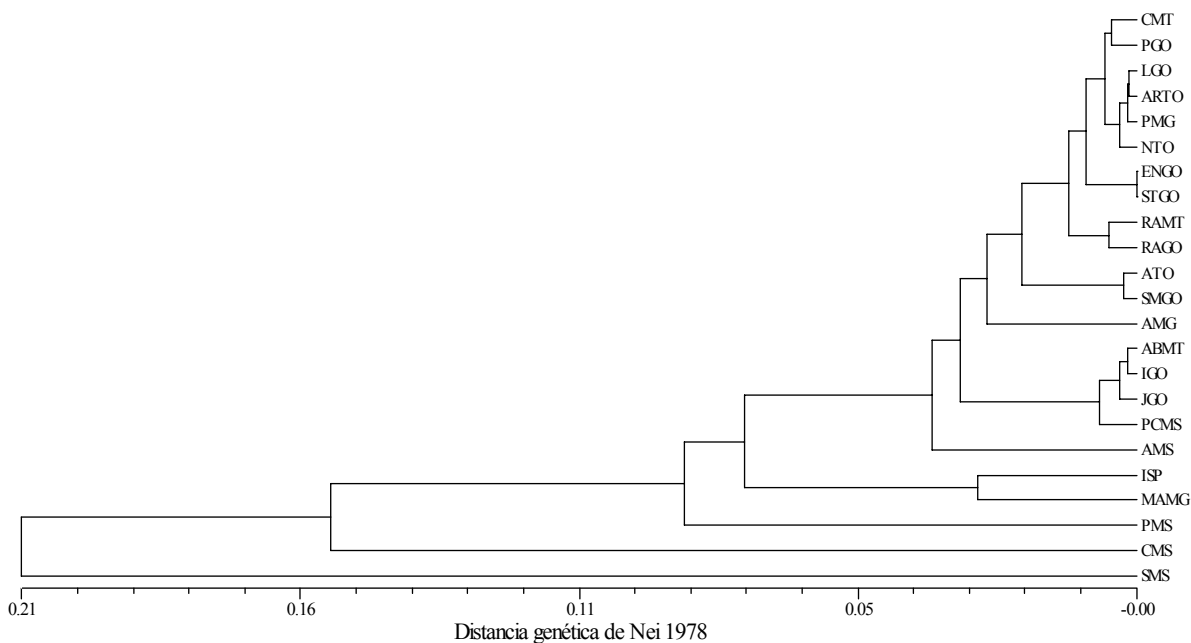
As estimativas de estruturação genética com base nos dados de microssatélites genômico e do cloroplastidial são vistas como medidas de diferenciação com base na herança biparental e maternal, respectivamente (Oddou-Muratorio et al., 2001; Salgueiro et al., 2004; Petit et al., 2005). Os resultados observados neste estudo reforçam os

pressupostos de que os locos microssatélites genômicos tendem a fornecer uma informação que permite capturar uma diferenciação contemporânea, enquanto os cloroplastidiais estão mais relacionados com a conectividade histórica entre as subpopulações (Sork et al., 1999; Provan et al., 2001).

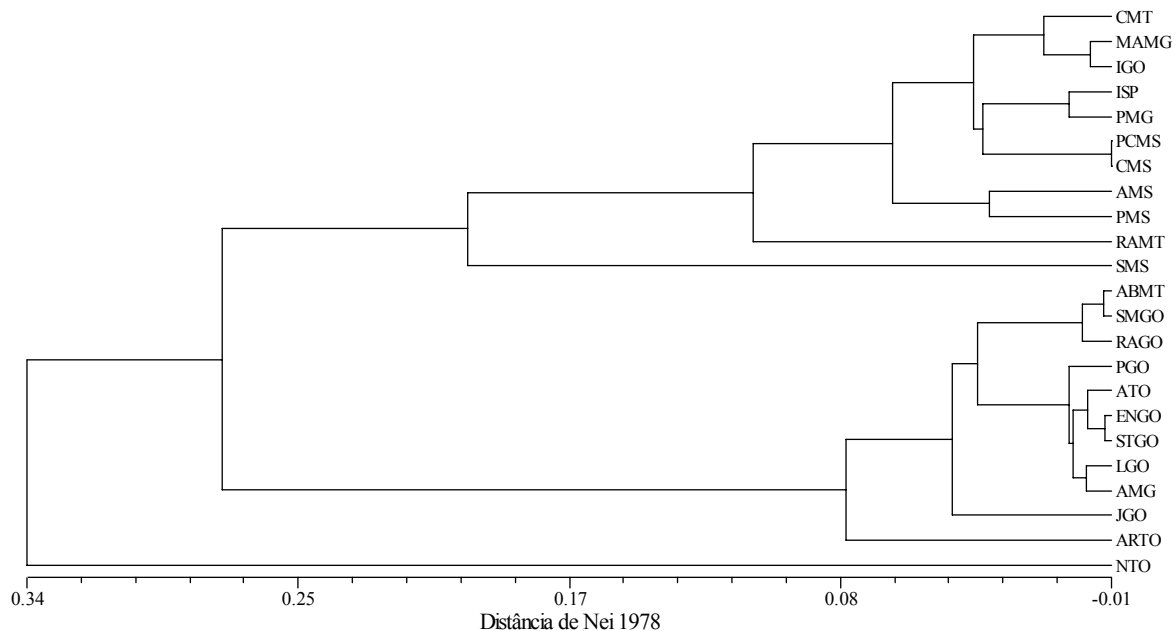
Estas estimativas também podem ser relacionadas aos padrões de fluxo gênico biparental e via semente exclusivamente e, pelos de valores de estruturação observados, pode-se sugerir que o fluxo gênico biparental é mais efetivo. De fato, pelo cálculo da taxa de migração de Wright 1951 ( $Nm$ ), que é calculado com base no  $F_{ST}$  e equivale ao médio número de migrantes por geração, em que,  $Nm = 1/4((1/F_{ST}) - 1)$ , tem-se  $Nm = 1,19$  e  $Nm = 0,64$ , para os dados de microssatélites genômicos e cloroplastidiais, respectivamente, percebe-se que o  $Nm$  biparental é maior. Entretanto, as razões de migração via pólen e semente ( $r = m_p/m_s$ ) estimadas, com base nos valores dos diferentes índices de subdivisão populacional (Tabela 4.5), indicam a migração via semente está sendo mais efetiva para a espécie *D. alata*, uma vez que os valores foram todos menores que um.

Estes resultados estão de acordo com o esperado para espécies polinizadas por insetos, que normalmente alcançam distâncias relativamente pequenas e dispersadas por animais cujo alcance de dispersão é maior (Oddou-Muratorio et al., 2001; Petit et al., 2005). Entretanto, *D. alata* além de apresentar dispersão por mamíferos (macacos e morcegos, principalmente) também dispersa suas sementes por barocoria (Ribeiro et al., 2000; Sano et al., 2004) o que tende a diminuir a área geográfica do alcance da dispersão (Soares et al., 2008ab).

A análise de divergência genética foi muito similar para as estimativas do  $N_{ST}$  par a par e da distância de Nei 1978, com base nos marcadores microssatélites genômicos ( $r = 0,7653$ ;  $p = 0,000$ ) e também para os cloroplastidiais ( $r = 0,8274$ ;  $p = 0,000$ ). Desta maneira optou-se por utilizar apenas a distância genética de Nei 1978, pois esta apresentou maiores valores de correlação cofenética na realização dos agrupamentos para os dois conjuntos de locos (Figuras 4.4 e 4.5).



**Figura 4.4.** Dendrograma construído a partir da análise de três locos microssatélites genômicos em 23 subpopulações de *Dipteryx alata*. Correlação cofenética:  $r = 0,913$  ( $p = 0,0002$ ).

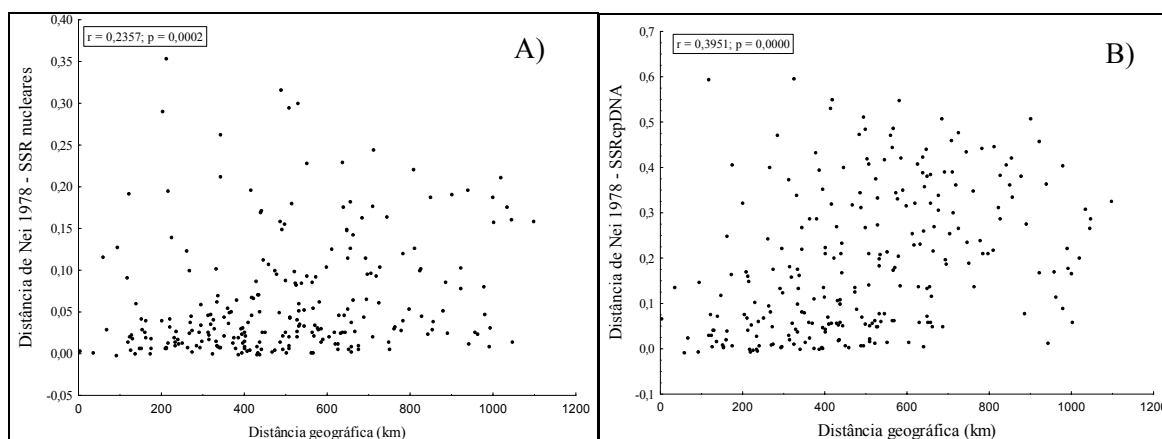


**Figura 4.5.** Dendrograma construído a partir da análise de locos dois microssatélites cloroplastidiais em 23 subpopulações de *Dipteryx alata*. Correlação cofenética:  $r = 0,778$  ( $p = 0,0002$ ).



O agrupamento gerado a partir dos dados de microssatélites genômicos não permitiu a visualização clara de grupos, com exceção de uma diferenciação forte da subpopulação de Sonora – MS (SMS) em relação a todas outras (Figura 4.4). Tal diferenciação fez com que todas as outras subpopulações fossem agrupadas de modo hierárquico sem a formação de grupos. Todavia, talvez em função da evolução mais lenta, as regiões genômicas cloroplastidiais permitem a captura dessa informação mais histórica do fluxo gênico, possibilitando a visualização da formação de três grupos bem distintos, sendo que um é formado apenas pela subpopulação NTO (Figura 4.5). Tal padrão corrobora a hipótese de dupla origem materna para as subpopulações de *D. alata*, uma vez que se verifica que as subpopulações do sudoeste (MS) ficaram todas em um só grupo, se diferenciando das do nordeste (ARTO e NTO).

As distâncias genética e geográfica se apresentaram positiva e significativamente correlacionadas para os dois conjuntos de dados moleculares (Figura 4.6), com valores iguais a 0,236 ( $p = 0,0002$ ) e 0,395 ( $p = 0,000$ ), para microssatélites genômicos e cloroplastidiais, respectivamente. Uma correlação entre divergência genética e distância geográfica pode ser esperada sob diferentes modelos de evolução (Manly, 1986). As subpopulações podem então estar divergindo sob um processo estocástico simples (deriva genética), contrabalançado por fluxo gênico em curtas distâncias, o que gera um padrão de “alpondras” (*stepping-stone*) (Kimura & Weiss, 1964), já que *D. alata* apresenta uma distribuição de suas subpopulações de modo discreto em sua área de distribuição geográfica (Diniz-Filho, 1998).



**Figura 4.6.** Relação entre distância geográfica e distâncias genéticas de Nei 1978 entre 23 subpopulações de *Dipteryx alata*, calculadas a partir de três locos microssatélites genômicos (A) e dois locos microssatélites cloroplastidiais (B).

#### 4.4 CONCLUSÕES

- As subpopulações de *Dipteryx alata* apresentam considerável variabilidade genética, detectada tanto pelos marcadores microssatélites genômicos quanto os cloroplastidiais.
- O sistema reprodutivo da espécie *D. alata* se caracteriza pela alogamia, conforme indica a taxa aparente de fecundação cruzada.
- A variabilidade genética apresenta-se significativamente estruturada nas subpopulações, com base nos locos microssatélites genômicos e cloroplastidiais analisados.
- A migração via semente desempenha papel preponderante no fluxo gênico total, em relação à migração via pólen, para a espécie *D. alata*.
- Existe padrão espacial da variabilidade genética nas subpopulações estudadas.

## 5 ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E FLUXO GÊNICO INTRAPOPULACIONAL EM *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE)

### RESUMO

Os padrões de dispersão de pólen e semente influenciam diretamente a estrutura genética espacial intrapopulacional em plantas. Uma maneira indireta e relativamente rápida de se avaliar o comportamento da dispersão de pólen e semente é pelo método de análise de marcadores nucleares e cloroplastidiais aliado ao georeferenciamento das plantas dentro das populações. O objetivo geral deste estudo foi determinar o fluxo gênico aparente a partir da avaliação da estrutura genética espacial em população natural de *Dipteryx alata* utilizando marcadores microssatélites genômicos e cloroplastidiais. Foram coletadas 210 plantas nos Estados do Mato Grosso (RAMT) e Goiás (RAGO), ao longo das margens do alto Rio Araguaia. Estas plantas foram georeferenciadas e analisadas geneticamente com base em três locos microssatélites genômicos e dois cloroplastidiais. As estimativas dos parâmetros genéticos de diversidade foram semelhantes entre as margens do rio, com valores ligeiramente maiores para RAMT. A estimativa da taxa de fecundação cruzada aparente (0,9434), confirma a reprodução por alogamia no barueiro. O baixo nível de diferenciação entre as subpopulações das duas margens do rio simultaneamente, indica que o rio Araguaia não confere uma barreira física efetiva ao fluxo gênico. O tamanho efetivo de vizinhança, ou seja, o número médio de indivíduos numa área onde ocorre panmixia, para os dados de microssatélites genômicos e cloroplastidiais foram iguais a 85,64 e 22,99, respectivamente, indicando que a dispersão de sementes é mais restrita. O correlograma gerado a partir dos dados cloroplastidiais apresenta um padrão clinal de variação mais evidente do que o proveniente dos dados de microssatélites genômicos, o que sugere que a presença da estrutura genética espacial deve ser mais influenciada pelo padrão de dispersão da semente. A presença de autocorrelação espacial enfatiza a necessidade de se respeitar os limites de distância geográfica ao amostrar plantas para fins de conservação ou uso de germoplasma para o melhoramento.

*Palavras-chave:* área de vizinhança, autocorrelação espacial, baru, microssatélites.

## ABSTRACT

SPATIAL GENETIC STRUCTURE AND INTRAPOPOPULATIONAL GENE FLOW IN *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE)

The patterns of pollen and seed dispersal directly affect the intrapopulation spatial genetic structure of plant populations. An indirect and relatively fast way to evaluate the behavior of pollen and seed dispersal is based on analyses of nuclear and chloroplastidial markers, allied to the computational resources and plant georeferencing within populations for an analytical improvement. The goal of this study was to determine the apparent gene flow through the evaluation of the spatial genetic structure in a natural population of *Dipteryx alata* using genomic and chloroplastidial microsatellite markers. 210 plants were sampled throughout the margins of the Araguaia River that separates the Mato Grosso and Goiás States, Brazil. Plants were georeferenced and genetically analyzed based on three genomic and two chloroplastidial microsatellite loci. Estimations of the genetic diversity parameters were similar between both margins, with slightly higher values on samples from Mato Grosso State. The estimation of the apparent cross-fertilization rate (0.9434), confirm the alogamic reproduction in baru “tree”. The low level of differentiation considering plants from both margins of the river at the same time indicated that the Araguaia River is not a physical barrier to effective gene flow. The effective size of the neighborhood, i.e., the mean number of individuals in an area where panmixia occurs was 85.64 and 22.99 for genomic and chloroplastidial microsatellite data, respectively, indicating that seed dispersal is more restricted. The correlogram generated with chloroplastidial data presented a cline pattern of variance more evident than with genomic microsatellite data, suggesting that the presence of spatial genetic structure is being more influenced by seed dispersal. The presence of spatial autocorrelation emphasizes that several samples from subpopulations are required to support conservation efforts or the use of germplasm for breeding.

*Key words:* “baru” tree, microsatellites, neighborhood size, spatial autocorrelation.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutivo é um dos principais fatores que influenciam a estrutura e a dinâmica da variabilidade genética nas plantas (Bawa, 1979; Loveless & Hamrick, 1984). As espécies que se reproduzem preferencialmente por fecundação cruzada mantêm níveis maiores de variabilidade genética dentro das populações, enquanto as que realizam autofecundação com maior frequência, mantêm a maior parte da variabilidade genética entre as populações (Ritland & Jain, 1981; Kageyama et al., 1998; Ward et al., 2005; Lacerda et al., 2008a).

Os padrões e as distâncias de dispersão de pólen e semente influenciam diretamente a estrutura genética espacial intrapopulacional, uma vez que estes fatores são responsáveis pela determinação do padrão e da quantidade de fluxo gênico dentro e entre as populações de plantas (Ennos, 1994; Levin et al., 2003). Níveis elevados de fluxo gênico são necessários para a manutenção da coesão genética entre populações, enquanto níveis mais baixos propiciam um aumento da diferenciação genética, deriva genética e, possivelmente, seleção local (Epperson, 2000; Ward et al., 2005).

A fragmentação de habitats também contribui para a diminuição do número de indivíduos de uma população, favorecendo a perda de variação genética, pois a população remanescente pode passar a ter um tamanho efetivo menor que o mínimo adequado para a sua persistência e continuidade evolutiva (Kageyama et al., 1998; Jump & Peñuelas, 2006; Bittencourt & Sebbenn, 2007). A maior longevidade das árvores, associada à dispersão efetiva do pólen e da semente (formação de um indivíduo que chega à idade reprodutiva), podem fazer com que as espécies resistam por um período de tempo maior aos efeitos da fragmentação (Hamrick, 2004). Deste modo, estudos que permitam esclarecer os padrões de reprodução e dispersão das espécies de plantas são fundamentais para a compreensão da dinâmica microevolutiva, o que conseqüentemente colabora para a elaboração de estratégias mais efetivas que visem à persistência genético-demográfica das populações naturais (Hamrick, 2004; Ward et al., 2005; Trakhtenbrot et al., 2005). Estas questões devem ser respondidas com a integração dos estudos genéticos, ecológicos e demográficos da população a fim de possibilitar a obtenção de informações consistentes e relevantes para a conservação e o manejo racional (Burczyk et al., 2004; Diniz-Filho et al., 2008).

Uma das possibilidades de avaliar geneticamente populações naturais é a partir da utilização de dados obtidos com marcadores moleculares que estão disponíveis para os

estudos de genética de populações e ecologia molecular (Avisé, 2004; Selkoe & Toonen, 2006). Os marcadores microssatélites são especialmente úteis para a determinação dos padrões de fluxo gênico (Buczyk et al., 2004; 2006), parentesco e endogamia (Jones & Ardren, 2003; Sebbenn & Seoane, 2005) e estrutura genética espacial (Epperson, 2004), por apresentarem padrão de herança codominante, multialelismo, além de serem abundantes e bem distribuídos ao longo do genoma (Brondani et al., 1998; 2007; Li et al., 2002; Oliveira et al., 2006).

A utilização de locos microssatélites robustos aliado aos recursos computacionais e ao georeferenciamento preciso das plantas dentro das populações possibilitaram um aprimoramento dessas análises de estrutura genética espacial (Epperson, 2000; Vekemans & Hardy, 2004; Diniz-Filho et al., 2008). Uma maneira indireta e relativamente rápida de se avaliar o comportamento da dispersão via pólen e via semente é pelo método de análise de marcadores nucleares e cloroplastidiais (Latouche-Hallé et al., 2003; Martins et al., 2006; Dick et al., 2008).

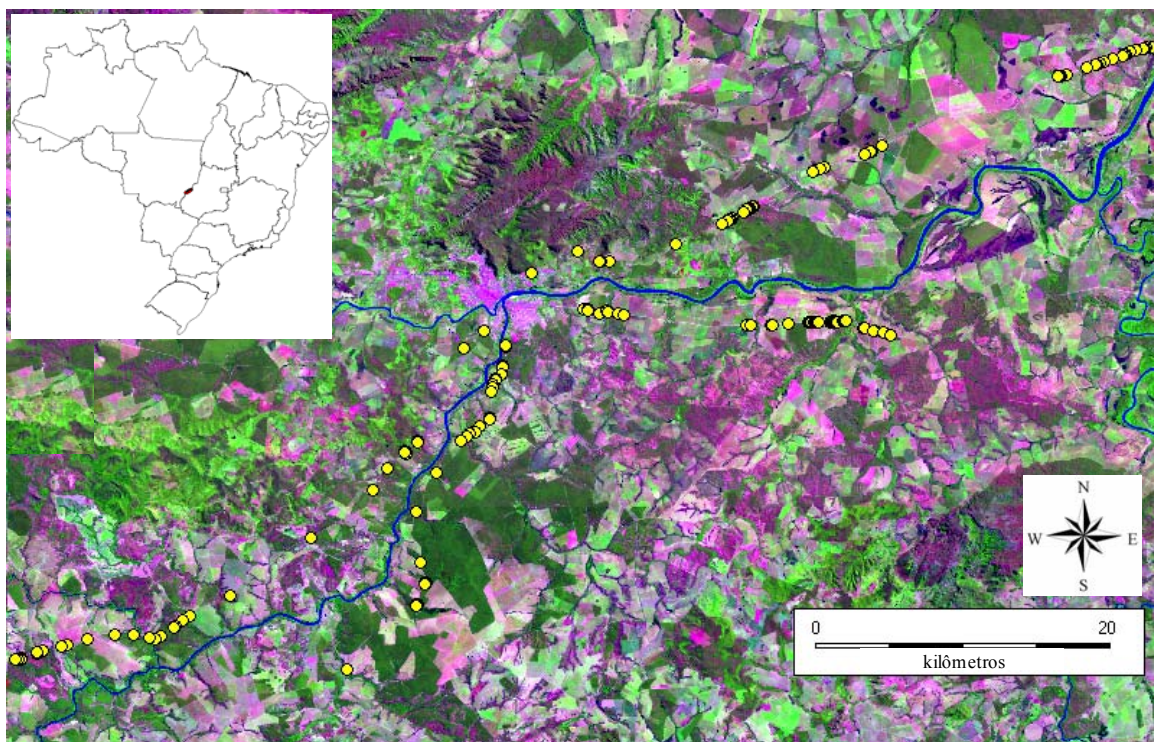
A espécie *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) é uma árvore conhecida popularmente como baru, que possui tronco reto com casca pouco sulcada e porte elevado, chegando até 15 m de altura e 15 cm a 40 cm de diâmetro à altura do peito (DAP) (Ribeiro et al., 2000; Sano et al., 2004). É uma planta hermafrodita, heliófila, que apresenta dispersão zoocórica (morcegos, macacos e o gado, nas regiões de pastagem) e barocórica (gravidade) (Ribeiro et al., 2000). A polinização deve ser realizada por insetos de flores pertencentes às Ordens Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera (Peres Filho & Dorval, 1995). Apesar da espécie *D. alata* ter distribuição irregular, às vezes pode formar grandes agrupamentos, ocorrendo principalmente em locais com solos mais drenados do Cerrado.

O barueiro apresenta grande importância ecológica para o bioma, sendo classificado como espécie-chave do Cerrado por ser uma das poucas árvores que amadurece o fruto na estação seca e alimenta várias espécies da fauna (mamíferos, aves, insetos), em uma época que é de escassez de alimentos na região (Sano et al., 2004). Além disto, *D. alata* faz parte do grupo de espécies nativas usadas pela população regional como fonte complementar de renda familiar, pela exploração extrativista de seu fruto, o baru, para fins alimentícios.

O objetivo geral deste estudo foi determinar o fluxo gênico aparente a partir da avaliação da estrutura genética espacial em população natural de *Dipteryx alata* utilizando marcadores microssatélites genômicos e cloroplastidiais.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico para o presente estudo foi coletado nos Estados do Mato Grosso (RAMT) e Goiás (RAGO), ao longo das margens do alto rio Araguaia (Figura 5.1). Esta área foi escolhida por ser uma região de ampla ocorrência da espécie *Dipteryx alata*. Foram coletadas folhas de 210 plantas, sendo 105 em cada uma das margens do rio. Estas plantas foram mapeadas utilizando as coordenadas geográficas de cada planta plotadas em imagens de satélite (Landsat-7/ETM+, obtidas em dezembro de 2008 no sítio [www.sieg.go.gov.br](http://www.sieg.go.gov.br)), utilizando o programa DIVA-GIS versão 5.2 (Hijmans et al., 2005).



**Figura 5.1.** Distribuição geográfica de 210 plantas, da espécie *Dipteryx alata*, sobre a imagem de satélite do local de coleta, às margens do alto Araguaia, nos estados do Mato Grosso e de Goiás.

O DNA genômico total foi extraído, a partir das folhas, conforme o protocolo de extração descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998) que utiliza o CTAB como detergente catiônico. Este protocolo consiste em minipreparações de DNA diretamente em microtubos de 2,0 mL, a partir de algumas dezenas de miligramas de tecido vegetal. Após a extração, o DNA total foi quantificado com o auxílio de um marcador de peso molecular

(*Low DNA mass ladder* da Invitrogen®), em gel de agarose 1% e tampão para eletroforese TBE 1X. Em seguida, o DNA foi diluído para uma concentração de, aproximadamente, 2,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

Foram utilizados três iniciadores de locos microssatélites genômicos, sendo um (BM164) originalmente desenvolvido para a espécie *Phaseolus vulgaris* (feijão) e transferido para *D. alata* (Garcia et al., 2007), e dois (Da\_E06 e Da\_E12) desenvolvidos para a espécie *D. alata* (Tabela 5.1) (Soares et al., dados ainda não publicados). Também foram utilizados dois locos microssatélites cloroplastidiais (ccmp-02 e ccmp-10) desenvolvidos por Weising & Gardner (1999) e padronizados para *D. alata* (Tabela 5.1). A amplificação foi feita a partir de reações de PCR contendo cerca de 15 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA e 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda). Os fragmentos resultantes foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, utilizando tampão TBE 1X, com 90W por cerca de duas horas. A coloração foi realizada com nitrato de prata, segundo o protocolo de Creste et al. (2001) e, após a secagem das placas, o tamanho dos alelos foi determinado por comparação com marcador de peso molecular padrão 10 pares de bases (Invitrogen®).

**Tabela 5.1.** Locos microssatélites genômicos (SSRg) e cloroplastidiais (SSRcp) analisados em duas subpopulações de *Dipteryx alata*. Ta refere-se à temperatura de anelamento do iniciador; A ao número de alelos;  $H_e$  à heterozigiosidade esperada e  $f$  ao índice de fixação intrapopulacional.

SSRg	Sequência dos iniciadores 5'-3'	Motivo	Ta(°C)	A	$H_e$	$f$
BM164	CCACCACAAGGAGAAGCAAC ACCATTCAGGCCGATACTCC	(GT) <sub>9</sub> (GA) <sub>21</sub> <sup>1</sup>	56	2	0,0142	-0,0048
Da_E-06	TGCAGCATAAAAATTGCGAA TTACCCCAAAGCCTCAAGAA	(AAAT) <sub>17</sub>	60	3	0,1404	0,1482
Da_E-12	CCTTCTATGCGCTCTCTGCT TACTTCAACGCCAGCTTCCT	(ATTTTT) <sub>18</sub>	64	3	0,2563	-0,0219
SSRcp						
ccmp02	GATCCCGGACGTAATCCTG ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	(A) <sub>11</sub> <sup>2</sup>	56	5	0,6826	—
ccmp10	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	(T) <sub>14</sub> <sup>2</sup>	56	1	0,0	—

<sup>1</sup>Motivo observado na espécie *Phaseolus vulgaris*. <sup>2</sup> Motivo observado na espécie *Nicotiana tabacum*.



A partir da matriz de genótipos de locos microssatélites genômicos ( $2n$ ) e cloroplastidiais ( $n$ ) foram estimados, os parâmetros genéticos:  $A$ , número médio de alelos por loco;  $H_e$ , heterozigosidade esperada e  $f$ , índice de fixação populacional (apenas para os dados de microssatélites genômicos), utilizando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001). A taxa de fecundação cruzada aparente foi estimada de acordo com a relação entre os valores do índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), em que  $\hat{t}_a = \frac{1 - \hat{f}}{1 + \hat{f}}$ .

A proporção da variabilidade genética entre subpopulações (coeficiente de correlação entre genes dentro de subpopulações com relação à população total) medida pelo  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham, 1984) foi estimada entre as duas margens do rio para a obtenção da taxa de migração de Wright, 1951, que equivale ao número de migrantes por geração, na qual,  $Nm = \frac{1}{4} \left( \frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$ . Com base neste resultado foi possível calcular o

tamanho efetivo de vizinhança ( $\hat{N}_b$ ), utilizado para estimar o número médio de indivíduos numa área onde ocorre panmixia, como descrito a seguir:  $\hat{N}_b = 2\pi\hat{N}_m$  (Slatkin, 1985; Slatkin & Barton, 1989). A razão de migração via pólen e semente ( $r = m_p/m_s$ ) entre as margens do rio Araguaia foi estimada conforme a equação (Ennos, 1994; Petit et al.,

2005):  $r = \frac{m_p}{m_s} = \frac{\left[ \left( \frac{1}{F_{STn}} - 1 \right) (1 + F_{IS}) - 2 \left( \frac{1}{F_{STcp}} - 1 \right) \right]}{\left( \frac{1}{F_{STcp}} - 1 \right)}$  em que,  $F_{STn}$  e  $F_{STcp}$  correspondem às

estimativas de diferenciação entre as duas subpopulações com base nos dados de microssatélites genômicos e cloroplastidiais, respectivamente e  $F_{IS}$  é o índice de fixação intrapopulacional que, em populações exogâmicas, pode ser considerado igual a zero.

A avaliação do padrão de estrutura genética espacial foi realizada, considerando as duas margens do rio como uma única população, com base no índice de Moran ( $I$ ) médio, utilizando o programa SGS (Degen, 2000). Este índice é calculado para cada classe de distância, pré-definida pelo usuário, da seguinte maneira:

$$I_q = \frac{n \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n w_{ij} (a_i - \bar{a})(a_j - \bar{a})}{W \sum_{i=1}^n (a_i - \bar{a})^2} \quad W = \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n w_{ij}$$

em que,  $n$  é o número total de amostras (indivíduos) e  $w_{ij}$  é o número de pares de indivíduos no intervalo de distância  $s_q$ . Para dados diplóides,  $a_i$  é 1, se o  $i$ ésimo indivíduo for homozigoto, 0,5 se for heterozigoto e 0 se ele não tiver o dado alelo. Para haplótipos,  $a_i$  é 1 se o  $i$ ésimo indivíduo apresentar o dado haplótipo e 0 se não apresentar. O valor  $\bar{a}$  corresponde ao valor médio de  $a_i$  para todos os  $n$  indivíduos. Para o conjunto de locos a autocorrelação é calculada somando o numerador e denominador da primeira equação com o número total de alelos. O valor esperado para o caso de ausência de autocorrelação é dado por  $-1/(n-1)$ . Altos valores indicam autocorrelação positiva e baixos valores, autocorrelação negativa (Degen, 2000). A significância do parâmetro foi testada com a realização de 1000 permutações determinando-se um intervalo de confiança de 95%. Os valores obtidos foram representados graficamente em correlogramas múltiplos.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os locos microssatélites genômicos apresentaram entre dois e três alelos, com uma heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) média igual a 0,137. As estimativas dos parâmetros genéticos de diversidade foram semelhantes entre as margens do rio Araguaia, com valores ligeiramente maiores para RAMT (Tabela 5.2). O valor de diversidade genética encontrado para esta população (0,136) foi bem menor do que o estimado ( $H_s$ ) para três populações de *D. alata* com base em marcadores RAPD (0,314) (Soares et al., 2008). Este valor de diversidade tem uma relação com o número baixo de alelos por loco, uma vez que as estimativas de diversidade genética com base em marcadores microssatélites são, em geral, mais altas para outras espécies arbóreas (Collevatti et al., 2001; Zucchi et al., 2003; Azevedo et al., 2007).

**Tabela 5.2.** Parâmetros de diversidade genética de plantas da espécie *Dipteryx alata* população coletada nas duas margens do rio Araguaia (RAMT e RAGO) estimados com base em locos microssatélites genômicos.

Local	A	$H_e$	$H_o$	$f$	$t_a$
RAMT	2,33	0,1513	0,1371	0,0943	0,8276
RAGO	2,67	0,1207	0,1270	-0,0526	1,1111
Média	2,50	0,1360	0,1320	0,0291	0,9434

A taxa de fecundação cruzada aparente estimada com base no valor médio do  $f$ , considerando as plantas das duas margens do rio simultaneamente, foi alta (0,9434) (Tabela 5.2) e compatível com o esperado para uma espécie com sistema reprodutivo por alogamia, conforme o esperado para *D. alata* (Siqueira et al., 1993).

Entre os marcadores cloroplastídias, o loco *ccmp10* não apresentou polimorfismo e o loco *ccmp02* apresentou cinco alelos, com amplitude de variação entre 262 e 320 pares de bases. A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foi igual a 0,6826, sendo portanto um loco muito informativo. Os marcadores microssatélites cloroplastídias se destacam pela versatilidade de usos nos mais diversos tipos de estudos. No nível intraespecífico eles oferecem informações tanto sobre o relacionamento histórico entre as subpopulações quanto para estudos de fluxo gênico contemporâneo, devido ao seu alto polimorfismo (Provan et al., 2001).

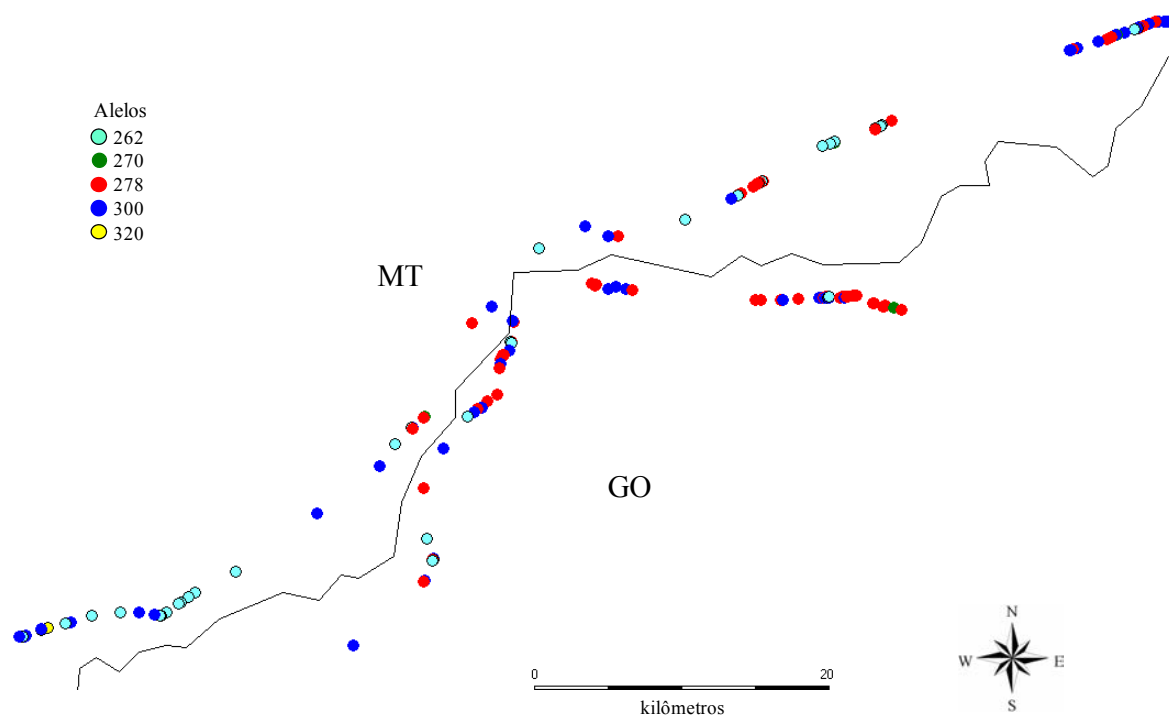
Os valores de  $F_{ST}$  obtidos para estas duas subpopulações foram iguais a 0,018 e 0,120, para os dados microssatélites genômicos e cloroplastídias, respectivamente, o que indica que o rio Araguaia não confere uma barreira física ao fluxo gênico biparental e que há uma diferenciação maior quando se considera os dados cloroplastídias (semente) entre as plantas avaliadas.

O tamanho efetivo de vizinhança, ou seja, o número médio de indivíduos numa área onde ocorre panmixia, considerando esses valores de  $F_{ST}$  para os dados de microssatélites genômicos e cloroplastídias foi igual a 85,64 e 22,99, respectivamente, indicando que a dispersão de sementes é mais geograficamente restrita. Isto também foi observado com base no valor da razão de migração via pólen e semente ( $r = m_p/m_s$ ) que foi igual a 5,439, indicando que a dispersão do pólen contribui mais efetivamente para o fluxo gênico total, atuando como um fator homogeneizador da variabilidade genética em escala local para a espécie *D. alata*.

Martins et al. (2006), assim como neste trabalho, encontraram valores de diversidade genética populacional ( $H_e$ ) maior para os locos microssatélites cloroplastídias em relação aos microssatélites genômicos, para populações de *Solanum lycocarpum* do Cerrado. Isto indica que a população foi colonizada por sementes vindas de diferentes plantas-mãe.

A distribuição espacial dos alelos do loco *ccmp02* no espaço geográfico (Figura 5.2) mostra que três deles (262, 278 e 300 pb azul claro, vermelho e azul escuro, respectivamente) são mais frequentes, totalizando uma frequência de 0,96. Verifica-se

também que não há uma diferenciação clara dos tipos de alelos entre as margens do rio, a não ser pelos alelos mais raros, para os quais se verifica a presença do alelo 320 pb (amarelo) apenas na margem do Estado do Mato Grosso. Um padrão que é observado é a ausência do alelo 278 bp (vermelho) na extremidade sudoeste do mapa, o que sugere uma possível colonização diferenciada neste local, considerando o presente conjunto de dados.

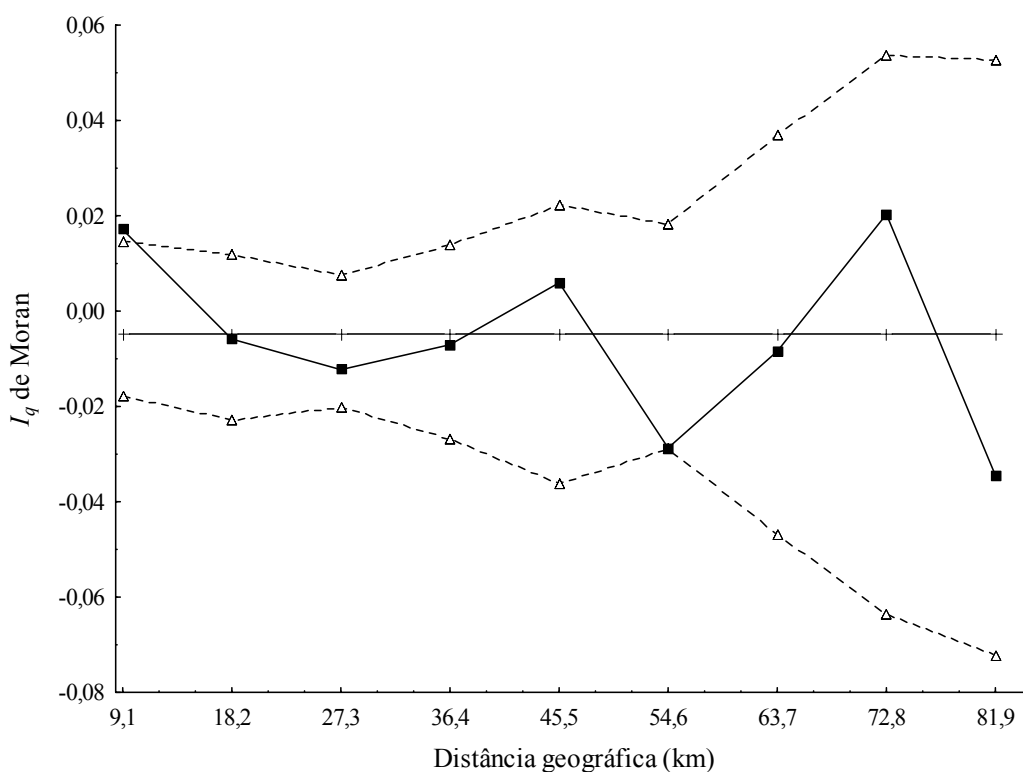


**Figura 5.2.** Distribuição geográfica dos alelos do loco microssatélite cloroplastidial ccmp02 em uma população natural de *Dipteryx alata* Vog coletada às margens do alto Araguaia. A linha refere-se ao limite entre os estados do Mato Grosso e de Goiás.

A distância máxima entre as plantas foi de aproximadamente 82 km e o índice de agregação foi de 0,137, o que indica que as plantas se distribuem de forma agregada, um resultado que está de acordo com o observado por Soares et al. (2008b) em outra região de ocorrência da espécie e em uma escala geográfica bem menor do que a deste estudo (distância máxima entre plantas de cerca de 2 km).

Devido ao esquema de amostragem das plantas ter acontecido em escala geográfica maior do que o observado em outros estudos (Latouche-Hallé et al., 2003; Moraes et al., 2005; Martins et al., 2006), vários testes foram realizados para definir a amplitude de variação das classes de distância geográfica para as análises de

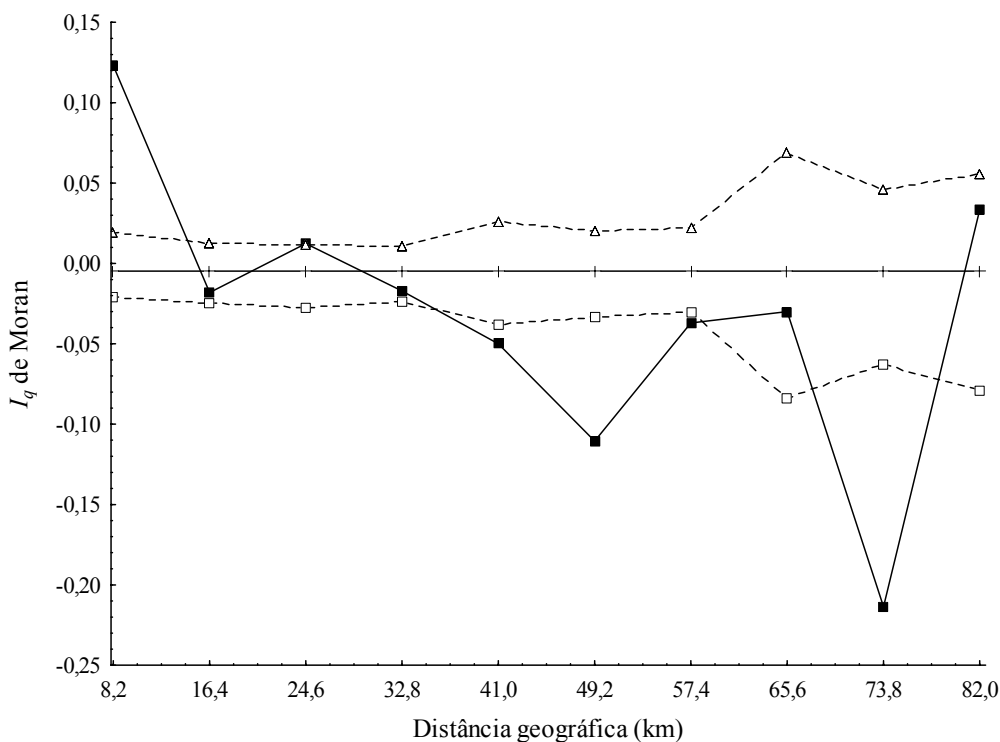
autocorrelação espacial (conforme orienta Degen, 2000). Optou-se por utilizar nove classes de distância geográfica, iniciando com distância máxima de até 9,1 km para os locos microsatélites genômicos. A análise de autocorrelação espacial, com base no índice ( $I_q$ ) de Moran, detectou uma estrutura genética espacial positiva e significativa (0,017,  $p = 0,015$ ) na primeira classe de distância (até 9,1 km) e nas últimas classes (até 54,6 km) encontrado valor negativo e significativo (-0,029,  $p = 0,025$ ) (Figura 5.3), o que representa um padrão clinal de variação que se associa a um modelo de fluxo gênico de isolamento por distância, em que plantas próximas no espaço geográfico são mais parecidas geneticamente, ficando mais diferentes geneticamente à medida que a distância geográfica aumenta (Wright, 1943).



**Figura 5.3.** Correlograma do Índice de Moran ( $I_q$ ) médio para três locos microsatélites genômicos em uma subpopulação de *Dipteryx alata* Vog., ao longo de nove classes de distância geográfica. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%, 1000 permutações) e a reta entre elas o ponto de ausência de autocorrelação (-0,0048).

O correlograma proveniente da análise dos dados cloroplastidiais (Figura 5.4) apresenta um padrão semelhante, com uma forma clinal mais evidente do que para os dados de microsatélites genômicos uma vez que, o valor do  $I_q$  de Moran na primeira

classe foi bem maior (0,12 contra 0,02 para os locos microssatélites genômicos), o que sugere que a presença da estrutura genética espacial deve estar sendo mais influenciada pelo padrão de dispersão da semente.



**Figura 5.4.** Correlograma do Índice de Moran ( $I_q$ ) para o loco microssatélite cloroplastidial ccmp02 em uma subpopulação de *Dipteryx alata* Vog., ao longo de dez classes de distância geográfica. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%, 1000 permutações) e a reta entre elas o ponto de ausência de autocorrelação (-0,0048).

O padrão clinal de distribuição da variabilidade genética tem sido observado em diferentes estudos de fluxo gênico em escala local (Degen et al., 2004; Moraes et al., 2005; Azevedo et al., 2007). Essas análises de autocorrelação espacial intrapopulacional são importantes, pois, uma vez detectada a presença de estruturação genética espacial, há um aumento da probabilidade de ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados, o que pode aumentar a endogamia dentro da população. Para fins de coleta de germoplasma, é recomendado utilizar o intervalo de distâncias em que existe autocorrelação como critério de amostragem, evitando a coleta de indivíduos pertencentes ao mesmo grupo de vizinhança (Diniz-Filho & Telles, 2002).

De modo geral, devido ao fato de os dados cloroplastidiais se relacionarem exclusivamente com o padrão de dispersão da semente, pode-se inferir que o alcance geográfico médio de dispersão por semente nesta população de *D. alata* ocorre por volta de até 8,2 km (em linha reta) e que para os dados de microssatélites genômicos (dispersão biparental) o alcance médio do fluxo se dá até cerca de 9 km (em linha reta), ou seja, estas distâncias são semelhantes entre si, com uma tendência de a dispersão pela semente contribuir mais para a estrutura genética espacial. Os baixos valores estimados para o índice de fixação intrapopulacional reforçam esta hipótese, indicando que a polinização teria um efeito homogeneizador da variabilidade genética intrapopulacional, conforme observado em alguns estudos (Latouche-Hallé et al., 2003).

As explicações para os padrões de dispersão biparental e por sementes podem estar relacionadas com os mecanismos de polinização e de dispersão da semente da espécie em questão (Latouche-Hallé et al., 2003, Vekemans & Hardy, 2004). Neste caso, um padrão de estruturação espacial mais forte para os dados cloroplastidiais era de se esperar para *D. alata*, em função do seu mecanismo de dispersão por barocoria, que limita a distância da semente em relação à planta mãe. Ao passo que dispersão zoocórica, que a espécie também apresenta, tenderia a diminuir a estrutura genética espacial quando o animal exibe capacidade de dispersão em longas distâncias (Hardesty et al., 2005). Porém, dependendo do mecanismo de forrageamento da espécie dispersora, por exemplo, quando os dispersores carregam os frutos para se alimentar em lugar seguro contra predadores, as sementes aparentadas permanecem e podem germinar num local próximo, o que tende a aumentar a estrutura genética espacial. Com relação ao padrão biparental, a autocorrelação espacial é esperada para espécies, como *D. alata*, que exibem polinização por insetos (Vekemans & Hardy, 2004).

As informações sobre os mecanismos de dispersão e polinização de *D. alata* são ainda muito incipientes e pouco precisas (Ribeiro et al., 2000; Sano et al., 2004). A exata informação sobre as espécies que realizam a dispersão e polinização possibilitaria um melhor esclarecimento dos padrões genéticos observados no presente estudo. Além disto, é importante ressaltar que embora a amostragem de indivíduos tenha sido adequada para a realização deste estudo é necessário que se amplie a quantidade de locos (Cavers et al., 2005). Como a principal hipótese levantada neste estudo foi a de que a dispersão de sementes contribui mais efetivamente para a estrutura genética espacial intrapopulacional, seria interessante a realização de um estudo em que a coleta fosse realizada incluindo o

mapeamento e a genotipagem de sementes e de plantas adultas, visando à estimativa de parentesco entre elas (Degen et al., 2004).

Os resultados obtidos neste estudo têm implicações importantes para a conservação da espécie *D. alata*, uma vez que a contribuição desproporcional de pólen e semente, para os eventos reprodutivos, pode levar à redução do tamanho efetivo populacional, o que cria uma situação de vulnerabilidade frente às possíveis mudanças ambientais (Lacerda et al., 2008b). Isso leva a necessidade de aumentar a distância entre matrizes para a coleta de gemoplasma e o número de sementes coletadas, visando uma melhor representatividade genética da amostra. A estrutura genética espacial intrapopulacional já havia sido detectada em subpopulações *D. alata* com escalas geográficas menores de até cerca de 2 km (Soares et al., 2008b), e o presente estudo mostra que a autocorrelação espacial pode estar em escalas geográficas bem maiores, o que aumenta a área de plantas geneticamente mais parecidas, enfatizando a necessidade de se amostrarem muitas subpopulações para fins de conservação ou uso de gemoplasma para o melhoramento.

#### 5.4 CONCLUSÕES

- A variabilidade genética observada nas subpopulações foi maior para os locos microssatélites cloroplastidiais do que para os de microssatélites genômicos.
- A estimativa da taxa aparente de fecundação cruzada foi compatível com o esperado para um sistema reprodutivo por alogamia, conforme o esperado para *D. alata*.
- A variabilidade genética dos locos microssatélites cloroplastidiais apresentou-se mais fortemente estruturada entre as subpopulações das margens do rio Araguaia, quando comparada aos locos microssatélites genômicos.
- A migração via pólen apresentou-se mais efetiva para o fluxo gênico total, em relação à migração via semente, em escala local para a espécie *D. alata*.
- Existe padrão clinal de distribuição local da variabilidade genética, com base nos locos microssatélites genômicos e cloroplastidial, sugerindo que esta estrutura tenha se originado pelo modelo de fluxo gênico de “isolamento por distância”.



## 6 PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS DE *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE) NO CERRADO: INFLUÊNCIA DOS EFEITOS HISTÓRICOS E CONTEMPORÂNEOS

### RESUMO

Na área de distribuição geográfica de uma dada espécie normalmente se verifica que as populações periféricas e centrais apresentam diferentes características genéticas e ecológicas. Sob modelo central-periférico, espera-se que populações periféricas, por causa da menor densidade populacional, sofram uma perda da variabilidade genética devido a uma maior intensidade de deriva genética e maior endogamia que pode ocasionar redução dos valores adaptativos individuais e adaptabilidade populacional, causando redução nas taxas de reprodução e aumento nas taxas de mortalidade e, conseqüentemente, podem levar estas populações à extinção. Para testar esta hipótese foram avaliadas as relações entre as estimativas de parâmetro genético de diversidade com os padrões de distribuição potencial de *Dipteryx alata*, uma espécie arbórea amplamente distribuída no Cerrado. Foi observado que parâmetros genéticos estimados para *D. alata* não se enquadram no clássico modelo central-periférico, pois as populações tidas como periféricas (de acordo com a distribuição geográfica dos pontos de coleta) tendem a exibir maiores valores para estas estimativas e as subpopulações das bordas Sul e Oeste do bioma apresentam os maiores valores para estas estimativas. A relação encontrada entre os valores estimados para o índice de fixação intrapopulacional  $f$  com o impacto humano indica que as subpopulações estudadas podem estar sofrendo as conseqüências dos processos de fragmentação e uso da terra na variabilidade genética, causado provavelmente pelo recente processo de ocupação do Cerrado.

*Palavras-chave:* centro de origem, conservação, microssatélite, modelagem de nicho.

## ABSTRACT

PATTERNS OF GENETIC VARIABILITY DISTRIBUTION IN CENTRAL AND PERIPHERAL POPULATION OF *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE) IN BRAZILIAN CERRADO: INFLUENCE OF HISTORICAL AND CONTEMPORARY EFFECTS

Along geographical distribution of species, different genetic and ecological characteristics can be observed in central and peripheral populations. According central-peripheral model it is expected that peripheral populations, because of their reduced effective population size, suffer loss of genetic variation due to drift and inbreeding. This can in turn reduces individual fitness and population adaptability, causing, lower reproduction and higher mortality rates and, sometimes, can take these populations to the extinction. To test this hypothesis the relation between genetic diversity parameters with patterns of potential geographic distribution was evaluated in natural populations of *Dipteryx alata*, a widely distributed fruit tree from Brazilian Cerrado. In general the genetic parameters don't follows a classical central-periphery model, because peripheral population (according geographical distribution of sampling) tended to demonstrate biggest of this genetic parameters value in Southern and Western sub-population. The relation found between index fixation ( $f$ ) with human impact indicated that subpopulation evaluate can be affected by fragmentation process and land use, caused probably by the recent process of Cerrado occupation.

*Key-words:* center of origin, conservation, microsatellite, niche model.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A estrutura genética das populações é determinada por um conjunto de processos como o fluxo gênico, que é intrinsecamente relacionado ao sistema de reprodução da espécie, seleção natural e deriva genética, que é tanto mais acentuada quanto menores forem as populações (Ginzburg & Golenberg, 1985), sendo esses processos fortemente influenciados por aspectos demográficos e pela distribuição espacial das populações.

Na área de distribuição geográfica de uma dada espécie normalmente se verifica que as populações periféricas e centrais apresentam diferentes características genéticas e ecológicas (Gaston, 2003; Sagarin et al., 2006). Essas diferenças podem ser descritas pelo modelo evolutivo central-periférico, inicialmente proposto nos anos de 1920, que prediz que as populações centrais apresentam maior tamanho efetivo e maior taxa de fluxo gênico do que populações periféricas (Soulé, 1973; Sagarin & Gaines, 2002; Eckert et al., 2008). Sob este modelo, espera-se que populações periféricas, por causa da menor densidade populacional, sofram uma perda da variabilidade genética devido a uma maior intensidade de deriva genética e maior endogamia que pode ocasionar redução dos valores adaptativos (*fitness*) individuais e adaptabilidade populacional, causando redução nas taxas de reprodução e aumento nas taxas de mortalidade e, conseqüentemente, podem levar estas populações à extinção (Eckert et al., 2008).

Os estudos que testam o modelo central-periférico voltaram a ganhar notoriedade na comunidade científica recentemente. Eckert et al. (2008) investigaram 134 artigos (total de 115 espécies) que avaliaram o modelo central-periférico. Deste total, 64% dos trabalhos corroboraram o modelo central-periférico, ou seja, encontraram menor diversidade genética em populações periféricas.

Apesar do crescente interesse da comunidade científica em investigar modelos centrais-periféricos, esses estudos são operacionalmente difíceis e por isso têm apresentado alguns problemas, pois exigem detalhes de parâmetros populacionais locais em amplas escalas geográficas (Gaston & Blackburn, 2000). Isto faz com que as comparações entre populações centrais e periféricas, por serem frequentemente baseadas em pequenos conjuntos de dados, não considerem toda extensão geográfica de ocorrência da espécie (Eckert et al., 2008). Assim, as técnicas de modelagem de nicho podem ser ferramentas importantes para conhecer a distribuição geográfica potencial das espécies, fornecendo subsídios para testar os modelos de distribuição da variabilidade genética na paisagem (Diniz-Filho et al., 2009a). Outro problema encontrado é o fato de que a maioria dos estudos que testam o modelo central-periférico são conduzidos com espécies de ambientes temperados do hemisfério norte, o que causa um forte viés biogeográfico (Eckert et al., 2008).

Embora muitos trabalhos tenham corroborado o modelo central-periférico, variáveis históricas ou contemporâneas podem alterar este padrão (Vucetich & Waite, 2003). Por exemplo, a existência de múltiplos picos de abundância determinados pelas

condições ambientais (Maurer, 1994), ou por variáveis históricas (p.e. glaciação do pleistoceno), que alteram a área de ocupação de uma espécie formando manchas de distribuição (Petit et al., 1997). Além disto, a ausência de modelo central-periférico pode ser ocasionada pela perda e fragmentação de habitats como consequência do impacto antrópico (Holderegger & Wagner, 2008).

O objetivo desse trabalho foi testar o modelo central-periférico na distribuição da variabilidade genética intrapopulacional em populações de *Dipteryx alata*, uma espécie de ampla distribuição no Cerrado. Especificamente, buscou-se avaliar se os parâmetros genéticos das populações de *D. alata*, estimados com base em marcadores microssatélites genômicos e cloroplastidiais, se distribuem de acordo com o modelo central-periférico e inferir quais e como os processos históricos e/ou contemporâneos (adequabilidade de habitat e ocupação humana) influenciam nesta distribuição.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Parâmetros de diversidade e estrutura genética foram obtidos em 23 populações, totalizando 775 plantas, da espécie *Dipteryx alata*. Estas análises foram realizadas com base em dados moleculares de três locos microssatélites genômicos, sendo um (BM164) transferido da espécie *Phaseolus vulgaris* (feijão) para *D. alata* (Garcia et al., 2007), e dois (Da\_E06 e Da\_E12) desenvolvidos para a espécie *D. alata* (Soares et al., dados não publicados), e dois locos microssatélites cloroplastidiais (ccmp02 e ccmp10, Weising & Gardner, 1999).

Da matriz de genótipos dos locos microssatélites genômicos, foram estimados o número médio de alelos por loco ( $A$ ); a heterozigosidade esperada sob condições do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ) e o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ) para cada uma das subpopulações, utilizando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001).

Para os microssatélites cloroplastidiais foram estimados o número de haplótipos ( $h$ ) e a diversidade gênica (haplotípica) por subpopulação, utilizando o programa Arlequin versão 3.11 (Excoffier et al., 2005) da seguinte maneira:

$$H = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right), \text{ em que } n \text{ é o número de genes na amostra; } k \text{ é o número de}$$

haplótipos e  $p_i$  é a frequência do  $i$ ésimo haplótipo.

A estrutura genética populacional pode ser influenciada por um modelo central-periférico de distribuição de populações, deste modo as estimativas de divergência genética para os dados cloroplastidiais, baseada nos valores de  $F_{ST}$  par a par, foram utilizadas para testar a influência do relacionamento histórico no padrão de distribuição geográfica da variabilidade genética intrapopulacional. Esta separação entre relação histórica e recente pode ser feita uma vez que o DNA cloroplastidial apresenta padrão de herança uniparental e, teoricamente, não sofre recombinação, o que faz com que ele contenha uma variabilidade genética mais conservada em relação ao genoma nuclear (Provan et al., 2001; Petit et al., 2005). O vetor associado ao primeiro autovalor da matriz de  $F_{ST}$  par a par foi utilizado como preditor dos componentes histórico (Diniz-Filho et al., 1998; 1999) que governa os padrões de distribuição central-periférico nas populações avaliadas.

A fim de modelar a distribuição geográfica potencial de *D. alata* foram utilizados dados de ocorrência da espécie, obtidos na literatura científica e na base de dados do Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA, <http://www.cria.org.br/>), acumulando um total de 448 pontos de ocorrência distribuídos em todo o bioma Cerrado, representando a mais completa base de dados de ocorrência de *D. alata*.

Para a modelagem de nicho, foram utilizadas seis variáveis climáticas, a saber, média anual da temperatura, sazonalidade da temperatura (coeficiente de variação), temperatura média no trimestre mais úmido, temperatura média no trimestre mais seco, precipitação no trimestre mais frio e precipitação no trimestre mais quente e uma variável topográfica (altitude). Todas as variáveis foram obtidas no sítio do Wordclim (<http://www.worldclim.org/>) sendo essas convertidas para resolução (abertura de malha) de 0.0417 graus (aproximadamente 4 km).

Cinco diferentes técnicas de modelagem de nicho foram utilizadas, sendo todos os modelos baseados em dados de presença (Tsoar et al., 2007). A distribuição geográfica potencial de *D. alata* foi modelada utilizando o Bioclim (Diva-GIS; Hijmans et al., 2005), as distância Euclidiana e Mahalanobis (Farber & Kadmon, 2003), Garp (*Genetic Algorithm for Rule-set Prediction*; Stockwell & Peters, 1999) e Maxent (*Maximum Entropy*; Philips et al., 2006, Philips & Dudík, 2008). Essas técnicas de modelagem têm sido amplamente utilizadas na literatura e muitos autores têm buscado determinar quais são os melhores modelos (Segurado & Araújo, 2004; Elith et al., 2006; Tsoar et al., 2007). Entretanto, não existe um modelo mais adequado para todas as situações, sendo frequente observar que,

para cada condição particular, um modelo pode se ajustar melhor do que outro. Desta forma, para o presente trabalho foi utilizada a proposta de Araújo & New (2007) que sugere combinar as ocorrências geográficas da espécie, modeladas pelas diferentes técnicas, o que gera um mapa com sobreposição dos cinco modelos citados.

Para a preparação do mapa de combinação dos modelos, inicialmente cada modelo foi truncado utilizando a técnica de “limiar mínimo” (*sensu* Cantor et al., 1999), para gerar os dados de presença e ausência dos modelos. Em seguida, os modelos foram sobrepostos, de tal forma que, as regiões do Cerrado que apresentem maior sobreposição de modelos, formem as regiões de menor incerteza de ocorrência de *D. alata*, ou seja, regiões geográficas que apresentem condições climáticas e/ou topográficas favoráveis para o estabelecimento da espécie, representando a variável ecológica a ser testada neste estudo.

A ocupação humana é um importante fator que pode estabelecer o isolamento entre populações locais (Manel et al., 2003; Holderegger & Wagner, 2008), além disso, o Bioma Cerrado tem passado desde os anos de 1960 por um forte processo de antropização, principalmente pela abertura de áreas para pastagem e lavouras anuais, parte delas atualmente sendo substituídas por áreas de plantio de cana-de-açúcar (Sawyer, 2008). Em função disto, foram usadas indicadores de ocupação humana e fragmentação de habitat para avaliar o efeito potencial sobre os padrões observados de variação genética dentro de populações locais.

Os dados de ocupação humana para cada população, foram coletados a partir dos valores de *Human footprint* (Sanderson et al., 2002), que combina dados globais de densidade populacional humana, uso do solo, disponibilidade de acessos (rodovias, hidrovias, etc.) e infraestrutura elétrica. Estes dados em conjunto são utilizados para gerar mapas de índices de ocupação humana (*Human footprint*), com resolução de 1km<sup>2</sup> (disponível em: [http://www.ciesin.columbia.edu/wild\\_areas/](http://www.ciesin.columbia.edu/wild_areas/), acessado em setembro de 2008).

Para a obtenção dos dados de fragmentação de habitat, foi estimado o percentual de vegetação remanescente para o bioma Cerrado numa resolução de 10 km<sup>2</sup>. Esses dados foram derivados do mapa de vegetação de remanescentes de Cerrado, recentemente desenvolvido pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA / PROBIO) (ver [www.lapig.iesa.ufg.br](http://www.lapig.iesa.ufg.br)), utilizando 114 cenas do satélite Landsat do ano de 2002 (principalmente de agosto, setembro e outubro).

Estas variáveis explanatórias foram agrupadas em dois conjuntos: o primeiro denominado “ecológico” que corresponde à sobreposição de modelos, ou seja, o soma dos modelos que predisseram a ocorrência da espécie no ponto de coleta de cada subpopulação; o segundo, denominado “humano”, corresponde ao percentual de remanescentes e ao impacto humano (*Human fottprint*) nos locais de coleta das subpopulações.

O modelo central-periférico foi testado comparando-se todas as variáveis genéticas (provenientes dos dados de microssatélites genômicos e cloroplastidiais), ecológica (distribuição potencial) e humanas (ocupação humana e fragmentação de habitat) obtidas. Estas comparações foram inicialmente feitas a partir da realização de correlações de Pearson entre variáveis investigadas (genéticas, ecológicas e humanas) com variáveis de posição geográfica de latitude e longitude, distância do centro do bioma e distância do centro da distribuição geográfica potencial de *D. alata* (estimada com base em modelagem de nicho anteriormente descrita).

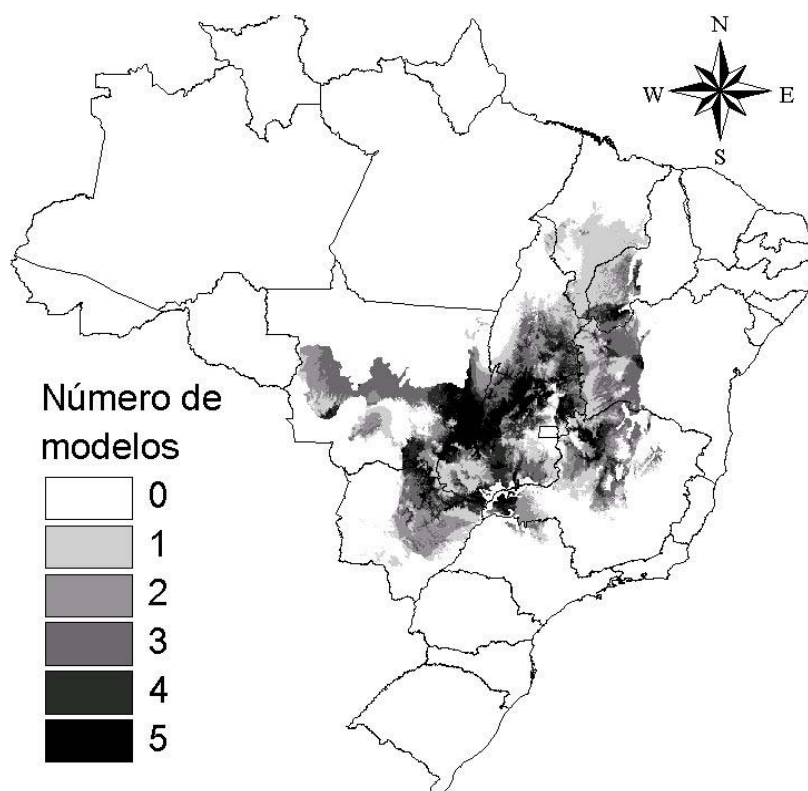
Em seguida, foi avaliado o acréscimo dos valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da análise de superfície de tendência quadrática (padrão parabólico) com relação à análise de superfície de tendência linear (modelando norte-sul ou leste-oeste), o que seria esperado caso estas variáveis se ajustassem ao modelo central-periférico.

Para o presente trabalho foram utilizadas regressões simples e múltiplas para relacionar parâmetros genéticos com variáveis explanatórias (Legendre & Legendre, 1998). No entanto, a não-independência das unidades amostrais (autocorrelação espacial), em uma regressão pode ocasionar um aumento do erro tipo I e, conseqüentemente, gerar interpretações errôneas em testes de significância baseado em hipótese nula (Hawkins et al., 2007). Deste modo, a não-independência das unidades amostrais foi testada pela avaliação da existência de autocorrelação espacial (I de Moran) nos resíduos das regressões, cuja significância foi testada com 1000 permutações (Diniz-Filho & Telles, 2002; Diniz-Filho et al., 2003). Uma vez detectado, o efeito da autocorrelação espacial foi removido usando a técnica de autovetores baseados em filtros espaciais, conhecida como PCNM (*principal coordinate of neighbor matrices*; Borcard & Legendre, 2002; Diniz-Filho & Bini, 2005). Em recente revisão, Diniz-Filho et al. (2009b) sugerem o uso dessa técnica para a remoção da autocorrelação espacial com dados genéticos.

O método de regressão parcial foi utilizado para decompor o efeito individual do impacto humano e da variável ecológica sobre a variabilidade genética (Legendre & Legendre, 1998). Todas as análises estatísticas (correlação, regressão, análise de superfície de tendência e autocorrelação espacial) foram feitas no programa SAM 3.0 (Rangel et al., 2006), disponível no sítio [www.ecoevol.ufg.br/sam](http://www.ecoevol.ufg.br/sam).

### 6.3 RESULTADOS

Os valores dos parâmetros genéticos estimados com base nos locos microsatélites genômicos e cloroplastidiais para as 23 populações de *D. alata* estão apresentados na Tabela 6.1. Pela análise de distribuição potencial da espécie *D. alata*, a maior sobreposição dos cinco modelos de nicho foi verificada principalmente na porção central oeste do bioma Cerrado (região do médio Araguaia) (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Mapa da combinação de cinco modelos de nicho (sobrepondo a ocorrência predita de cada modelo) que descrevem a distribuição geográfica potencial da espécie *Dipteryx alata*.

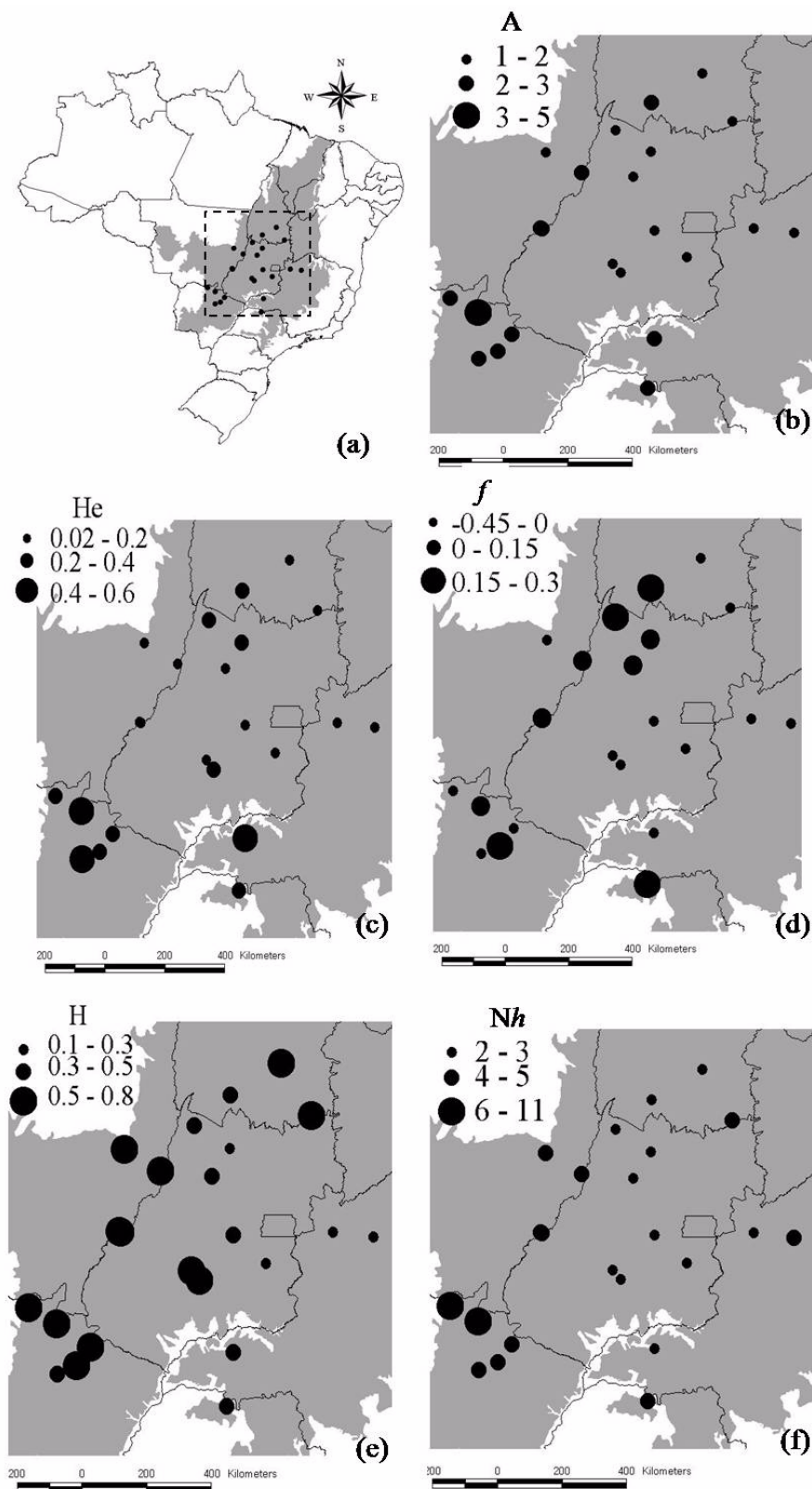


**Tabela 6.1.** Parâmetros de diversidade genética para locos microssatélites genômicos (SSRg) e cloroplastidiais (SSRcp) analisados em 23 subpopulações de *Dipteryx alata*.

Subpopulação	SSRg				SSRcp	
	<i>n</i>	<i>A</i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>f</i>	<i>N<sub>h</sub></i>	<i>H</i>
ABMT	35	2	0,15	-0,276	5	0,57
AMG	34	1,3	0,147	-0,45	2	0,117
AMS	35	4,3	0,431	0,006	8	0,503
ARTO	15	1,7	0,084	-0,057	5	0,771
ATO	35	2,3	0,251	0,243	3	0,39
CMS	13	2,7	0,531	-0,137	4	0,378
CMT	34	2,3	0,147	0,067	5	0,604
ENGO	12	2	0,228	0,118	2	0,167
IGO	13	2	0,234	-0,355	3	0,641
ISP	35	2,3	0,397	0,237	4	0,398
JGO	34	1,7	0,166	-0,187	3	0,542
LGO	35	1,3	0,068	-0,115	2	0,111
MAMG	35	3	0,446	-0,131	3	0,462
NTO	13	1,3	0,026	0	3	0,603
PCMS	13	2,7	0,32	0,258	5	0,628
PGO	40	1,3	0,024	-0,026	3	0,351
PMG	36	1,7	0,078	-0,101	4	0,162
PMS	13	3	0,288	-0,087	4	0,718
RAGO	105	2,7	0,121	-0,053	4	0,595
RAMT	105	2,3	0,151	0,094	5	0,686
SMGO	36	2	0,234	0,213	3	0,494
SMS	35	3	0,377	-0,2	11	0,604
STGO	12	2	0,177	0,033	2	0,303
Média	34	2,2	0,221	-0,025	4	0,373

*n*, número de plantas analisadas; *A*, número médio de alelos; *H<sub>e</sub>*, heterozigosidade esperada; *f*, índice de fixação intrapopulacional; *N<sub>h</sub>*, número de haplótipos; *H*, diversidade haplotípica.

As variáveis genéticas, com exceção do *f*, apresentaram uma tendência de correlação positiva com distância do centro do bioma e também com a distância do centro da distribuição da espécie (que é praticamente a mesma do centro do bioma), com exceção do *f* e *H* (Tabela 6.2). Este resultado indica que as variáveis em questão (*A*, *H<sub>e</sub>*, *h*) apresentam uma tendência de exibirem maiores valores nas bordas do bioma, sendo que os maiores valores estão nas bordas Sul e Oeste do bioma Cerrado, uma vez que foram observados valores positivos de correlação com a latitude e longitude (Tabela 6.2 e Figura 6.2). A diversidade haplotípica (*H*) apresenta um padrão de variação longitudinal forte, o que indica que os maiores valores de diversidade estejam a oeste no bioma (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Padrão geográfico dos parâmetros genéticos estimados em 23 subpopulações de *D. alata*.  $A$ , número médio de alelos;  $H_e$ , heterozigosidade esperada;  $f$ , índice de fixação intrapopulacional;  $H$ , diversidade haplotípica;  $Nh$ , número de haplótipos.

**Tabela 6.2.** Análise do padrão espacial dos parâmetros genéticos, para marcadores microssatélites genômicos (SSRg) e cloroplastidiais (SSRcp), ecológicos e de ocupação humana. São apresentadas correlações lineares com a distância do centro do bioma Cerrado (r Bioma), distância do centro da distribuição do Baru (r Baru), latitude (r Latitude), longitude (r Longitude), e ainda coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da análise de superfície de tendência (AST) linear e quadrática e o valor do incremento no modelo quadrático ( $\Delta R^2$ ).

Variável	r Bioma	r Baru	r Latitude	r Longitude	AST		
					$R^2$ (linear)	$R^2$ (quadrático)	$\Delta R^2$
<i>SSRg</i>							
A	<b>0,658</b>	0,11	<b>0,511</b>	<b>0,737</b>	<b>0,587</b>	<b>0,628</b>	0,041
$H_e$	<b>0,701</b>	0,371	<b>0,672</b>	<b>0,582</b>	<b>0,553</b>	<b>0,694</b>	0,141
$f$	-0,06	-0,094	-0,121	0,112	0,048	0,322	0,274
<i>SSRcp</i>							
H	0,289	-0,204	0,008	<b>0,503</b>	<b>0,309</b>	<b>0,367</b>	0,058
Nh	<b>0,613</b>	0,142	0,27	<b>0,621</b>	<b>0,385</b>	<b>0,707</b>	0,322
$F_{ST}$ par a par (Autovetor)	<b>0,724</b>	<b>0,449</b>	<b>0,611</b>	0,336	<b>0,379</b>	<b>0,490</b>	0,110
<i>Ecológica</i>							
Modelagem de nicho	<b>-0,446</b>	<b>-0,54</b>	<b>-0,538</b>	-0,045	<b>0,335</b>	0,433	0,098
<i>Ocupação humana</i>							
Fatores humanos	0,125	0,084	0,396	-0,012	0,199	0,366	0,167
Remanescentes	<b>-0,44</b>	<b>-0,457</b>	<b>-0,589</b>	-0,158	<b>0,359</b>	<b>0,626</b>	0,267

A, número médio de alelos;  $H_e$ , heterozigosidade esperada;  $f$ , índice de fixação intrapopulacional; H, diversidade haplotípica; Nh, número de haplótipos.

De modo geral, não foi verificado um consistente aumento do coeficiente de determinação ( $\Delta R^2$ ) para as variáveis genéticas, obtido pela análise de superfície de tendência, o que indica, novamente, uma não adequação de distribuição destas ao clássico padrão central-periférico (Tabela 6.2).

O primeiro autovetor da matriz  $F_{ST}$  par a par (SSRcp), que expressa a relação “genealógica ou filogenética” entre as populações, apresentou relação significativa com a distância do centro do Bioma e da distribuição da espécie, sendo igualmente significativo com a latitude e ainda apresentou um incremento, embora pequeno, no  $\Delta R^2$ . A relação mais forte foi com o centro do bioma e isto aliado ao incremento no  $\Delta R^2$ , sugere que estas populações apresentam um padrão de diferenciação central-periférico no tempo e no espaço evolutivo.

Ao contrário dos dados genéticos, o dado ecológico, derivado da sobreposição dos modelos de nicho nas subpopulações, apresentou um padrão central-periférico, apesar do pequeno incremento  $\Delta R^2$ . As regiões da borda do bioma Cerrado apresentaram poucas condições climáticas e/ou topográficas favoráveis para a ocorrência da espécie, principalmente da porção Sul, evidenciada pelo valor negativo de correlação deste dado com a latitude (Tabela 6.2).

Dentre as variáveis de ocupação humana, o dado *Human footprint* apresentou uma tendência de padrão central-periférico, no entanto a correlação foi maior com a latitude, indicando um incremento do impacto humano na porção Sul do bioma Cerrado. O percentual de remanescentes também apresentou padrão central-periférico, sendo encontrado maior número de remanescente na região norte do Bioma, uma vez que foi observada uma correlação negativa com a latitude. Apesar de indicarem efeitos semelhantes de padrão central-periférico, as variáveis “*Human footprint*” e remanescentes não apresentaram colinearidade ( $R = -0,2$ ;  $P = 0,37$ ) em função de estarem em direções opostas, o que era esperado, pois regiões com alto impacto teriam menos remanescentes.

De maneira geral, as variáveis genéticas foram pouco explicadas pelas variáveis humanas e ecológicas. Entretanto, o índice de fixação intrapopulacional  $f$  foi melhor explicado pelas variáveis humanas, sugerindo que maiores valores de endogamia são registrados em regiões de maior impacto humano (Tabela 6.3).

**Tabela 6.3.** Análise de regressão parcial dos parâmetros genéticos populacionais, com base em marcadores microsatélites genômicos (*SSRg*) e cloroplastidiais (*SSRcp*), com os aspectos ecológicos e de ocupação humana. Valores significativos em negrito (5%).

Parâmetros genéticos	R <sup>2</sup> (total)	R <sup>2</sup> (ecologia)	R <sup>2</sup> (humanos)	R <sup>2</sup> parcial		
				Ecologia	Compartilhado	Humanos
<i>SSRg</i>						
A	0,086	0,006	0,073	0,013	-0,007	0,08
H <sub>e</sub>	0,263	0,031	0,259	0,004	0,027	0,232
<i>f</i>	<b>0,372</b>	0,012	<b>0,367</b>	0,005	0,007	<b>0,36</b>
<i>SSRcp</i>						
H	0,269	0,002	0,25	0,019	-0,017	0,267
N <sub>h</sub>	0,045	0,029	0,005	0,04	-0,011	0,016
<i>F<sub>ST</sub></i> par a par (Autovetor)	0,143	0,002	0,137	0,006	-0,004	0,141

A, número médio de alelos; H<sub>e</sub>, heterozigosidade esperada; *f*, índice de fixação intrapopulacional; H, diversidade haplotípica; N<sub>h</sub>, número de haplótipos.

## 6.4 DISCUSSÃO

O modelo clássico de populações central-periférico baseado no modelo centro-abundante, para ser corroborado, torna necessário demonstrar que à medida que as populações se afastam do centro da sua distribuição geográfica deve ocorrer uma redução progressiva da abundância e o aumento do nível de isolamento geográfico. Entretanto, para os dados avaliados nesse trabalho, não foi possível obter estimativas de abundância das populações de *D. alata*. Deste modo, foram utilizadas medidas de adequabilidade de hábitat baseadas em modelagem de nicho (*sensu* Araújo & New, 2007), permitindo avaliar se de fato as populações periféricas (no espaço geográfico) estão localizadas em regiões de menor adequabilidade de hábitat (Anderson & Martinez-Meyer, 2004). Apesar dos resultados (principalmente a correlação com a distância do centro do bioma e do centro da distribuição de *D. alata*) demonstrarem menor adequabilidade nas bordas no bioma, o modelo de distribuição potencial da espécie não evidenciou um forte padrão central-periférico, demonstrado principalmente pelo pouco incremento do  $\Delta R^2$ , do ajuste quadrático em relação ao linear para os dados de adequabilidade. De fato, os mapas de sobreposição dos modelos de distribuição potencial sugerem maior adequabilidade na porção Centro-Oeste do bioma (Figura 6.1).

Os parâmetros genéticos estimados nesse trabalho são frequentemente utilizados para testar o padrão central-periférico (Garner et al., 2004; Howes & Loughheed, 2008). Mesmo que as estimativas de riqueza e de diversidade genética tenham uma tendência a serem redundantes, a maioria dos trabalhos utiliza ambas, uma vez que existem casos em que elas podem não apresentar os mesmos padrões (Eckert et al., 2008), conforme foi observado neste estudo para os valores de  $h$  (número de haplótipos) e  $H$  (diversidade de haplótipos), que apresentaram um padrão ligeiramente diferente (i.e., apenas  $H$  apresenta relação positiva e significativa com a longitude).

Os parâmetros genéticos ( $A$ ,  $H_e$ ,  $h$ ) estimados para *D. alata* não se enquadram no clássico modelo central-periférico, pois as populações tidas como periféricas (de acordo com a distribuição geográfica dos pontos de coleta) tendem a exibir maiores valores para estas estimativas e as subpopulações das bordas Sul e Oeste do bioma apresentam os maiores valores para estas estimativas, incluindo  $H$  (que apresentou relação com a longitude).

Por outro lado, é importante notar que alguns estudos têm demonstrado que o centro de origem de uma espécie é provavelmente uma região de elevada riqueza e diversidade genética (Harris et al., 2002; Barnett et al., 2006). Considerando esse pressuposto e os padrões de distribuição geográfica da variabilidade genética observados, é possível sugerir que a região Sudoeste do bioma seja a provável zona de expansão recente de *D. alata* e que se torna possível inferir que as regiões mais ao centro do bioma foram (re-) colonizadas recentemente e, por consequência tende a apresentar menores valores de diversidade genética.

A contribuição da história da colonização na diversidade genética de populações atuais pode ser avaliada de diferentes formas, dentre elas: (i) correlação ou regressão da diversidade genética com a distância geográfica do centro de origem (ou refúgio) (Garner et al., 2004); (ii) correlação ou regressão da diversidade genética com a latitude (por ser relacionado com o processo de colonização a partir das zonas de refúgio) (Van Rossum & Prentice, 2004; Johansson et al., 2006). Desta forma, para *D. alata*, a análise de correlação dos parâmetros genéticos estimados com a distância do seu provável centro de origem (região Sudoeste) revelou que  $H_e$  ( $r = -0,66$ ;  $P = 0,0006$ ),  $A$  ( $r = -0,75$ ;  $P = 0,00003$ ),  $H$  ( $r = -0,37$ ;  $P = 0,07$ ) e  $h$  ( $r = -0,54$ ;  $P = 0,006$ ) apresentaram relação negativa, ou seja, há uma redução dos valores à medida que as subpopulações se afastam do centro de origem. Além disto, foi observada, conforme descrito anteriormente, uma correlação positiva da diversidade genética com a latitude. Assim, esses resultados indicam que ocorreu um processo de colonização mais recente na região central do bioma, provavelmente originado pela expansão a partir da região sudoeste do bioma.

Esta hipótese é corroborada também pela correlação observada entre a relação “genealógica ou filogenética” das populações (autovetor do  $F_{ST}$  par a par SSRcp) e a latitude. Além disto, ao se realizar a correlação do autovetor do  $F_{ST}$  par a par com a distância do provável centro de origem de *D. alata* pode-se observar que as relações genealógicas (ou filogenéticas) diminuem à medida que as populações se afastam deste centro de origem ( $r = -0,48$ ;  $P = 0,0185$ ).

A área de ocupação geográfica das espécies e os atributos genéticos das populações de plantas do Cerrado são fortemente influenciados por variáveis climáticas, como a temperatura, umidade, atividades de fogo e drenagem do solo (Oliveira-Filho & Ratter, 2002). Além disso, as mudanças climáticas ocorridas ao longo da história têm sido consideradas um importante fator que alterou a distribuição geográfica das espécies

(Bonaccorso et al., 2006) e das características genéticas das populações (Hopper & Gioia, 2004; Ramos et al., 2007). Em espécies de ambientes temperados do hemisfério norte os fenômenos geológicos históricos, como a glaciação, promoveram reduções na área de distribuição de espécies, gerando refúgios (manchas de ocorrências e futuros centros de distribuição), assim, a diversidade genética de populações periféricas pode ser explicada como resultado da recolonização de áreas previamente glaciais (Hewitt, 1999).

No hemisfério sul, os períodos glaciais do Pleistoceno não foram marcados pelos avanços de geleiras como no hemisfério norte, mas pela queda da temperatura e umidade, principalmente ocorrido no último máximo glacial (UMG) entre os períodos de 20.000 e 10.000 AP (Barberi & Lima-Ribeiro, 2008). No Cerrado evidências palinológicas indicam que esse período foi marcado por um processo de expansão de uma vegetação aberta e retração da vegetação arbórea, caracterizadas como zonas de refúgio (Salgado-Labouriau et al., 1998; Ledru, 2002; Barberi & Lima-Ribeiro, 2008). Com o fim da UMG e início do Holoceno médio (7.000 AP), as condições climáticas sofrem novas mudanças e as regiões geográficas de vegetação arbóreas antes retraídas, começaram a expandir (Behling & Hooghiemstra, 2001; Ledru, 2002; Barberi & Lima-Ribeiro, 2008). Deste modo, pode-se inferir que as espécies com potencial de adaptação à regiões mais secas que ficaram refugiadas na porção Sul do bioma Cerrado tiveram potencial para expandir somente para as regiões central, norte e nordeste Brasil, pois a região ao Sul do Brasil foi ocupada principalmente pela Mata atlântica, enquanto que na região mais a Oeste do Brasil há uma depressão tectônica que formou uma enorme planície alagável (Pantanal) (Assine & Soares, 2004).

A espécie *D. alata* foi originalmente descrita por Vogel em 1837. É a única do seu gênero que ocorre no Cerrado, enquanto as outras ocorrem principalmente em matas da Floresta Amazônica (Ribeiro et al., 2000). Em função disso, Rizzini (1963) propõe que *D. alata* provavelmente é uma espécie vicariante de *Dipteryx odorata* (Aubl) Willd (cumaru). Segundo o autor, a grande plasticidade da forma dos folíolos de *D. alata*, em relação a diferentes regimes de luz, é uma adaptação de uma espécie originalmente da mata, para ambientes mais abertos. Uma análise citogenética (morfológica e evolutiva) de *D. alata* mostra que a espécie possui o número cromossômico  $2n = 16$ , metade da quantidade de *D. odorata* ( $2n = 32$ ), indicando que o barueiro é uma espécie diplóide, enquanto que o cumaru é poliplóide. Uma das explicações plausíveis para a relação evolutiva entre as duas espécies é a de que o cumaru tenha derivado do barueiro por poliploidização. Entretanto,

essa afirmativa é contrária a versão de Rizzini (1963) e, além disso, as razões ecológicas indicam que é mais provável que as espécies derivem da floresta para o Cerrado e não ao contrário (Torres, 2001).

O modelo de distribuição potencial da espécie aliado à hipótese levantada neste estudo sobre o ponto a partir do qual houve a expansão de *D. alata* no bioma Cerrado, ser na região sudoeste, não permite inferir as relações evolutivas entre *D. odorata* (cumaru) e *D. alata*. Para confirmar as relações evolutivas entre estas espécies seria necessário incluir populações de *D. odorata* na análise genética.

Dessa forma, a hipótese de provável zona de expansão da *D. alata* ser a região Sudoeste do Cerrado pode ser uma das explicações para a ausência de padrão central-periférico a partir do centro do bioma ou da distribuição potencial da espécie. Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho não refutam completamente este modelo, uma vez que se verifica um padrão central-periférico a partir da provável zona de expansão da espécie. Assim, além das propostas sugeridas por Eckert et al. (2008), sobre a necessidade de conhecer a distribuição da espécie para testar o modelo central-periférico, por exemplo, é aconselhável também se avaliar a provável zona de expansão da espécie, assumindo que a abundância e a diversidade genética (e outros atributos genéticos) diminuam à medida que as populações afastam-se desta.

A relação encontrada entre os valores estimados para  $f$  com o impacto humano indica que as subpopulações estudadas podem estar sofrendo as consequências dos processos de fragmentação e uso da terra na variabilidade genética, causado provavelmente pelo recente processo de ocupação do Cerrado (Klink & Moreira, 2002; Klink & Machado, 2005). Um exemplo de como os processos de ocupação humana podem influenciar na composição genética das espécies pode ser visto em Telles et al. (2007). Entretanto, é importante considerar ainda que *D. alata* é frequentemente preservada em regiões de pastagem, o que sugere que estas regiões seriam importantes para a sua conservação (Soares et al., 2008). No entanto, as áreas de pastagem parecem não favorecer o recrutamento de novos indivíduos (Bassini, 2008) da espécie, uma vez que foram verificados valores mais elevados para o índice de fixação ( $f$ ) na porção noroeste do Estado de Goiás, que é uma típica região de pastagem.



## 6.5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o uso de técnicas de modelagem de nicho, indicadores dos processos de ocupação humana, bem como inferência sobre processos históricos podem auxiliar na proposição de um cenário evolutivo possível com base nos diferentes parâmetros genéticos ao longo da distribuição espacial das subpopulações de *D. alata*. Assim, baseado nos elevados valores de diversidade genética encontrados na região Sudoeste do bioma Cerrado aliado aos padrões de distribuição desta variabilidade a partir deste ponto é possível inferir que o modelo central-periférico se ajusta à provável zona de expansão das subpopulações estudadas. Além disso, fenômenos contemporâneos, como a ocupação humana, parecem estar influenciando na atual composição genética das populações *D. alata* no Cerrado.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

- A estratégia de desenvolvimento de iniciadores a partir de biblioteca shotgun foi eficiente para a detecção de regiões microssatélites com diferentes composições e tamanhos dos motivos de repetição.
- As subpopulações de *Dipteryx alata* apresentam considerável variabilidade genética, detectada tanto pelos marcadores microssatélites genômicos quanto os cloroplastidiais.
- O sistema reprodutivo da espécie *D. alata* se caracteriza pela alogamia, conforme indica a taxa aparente de fecundação cruzada.
- A variabilidade genética apresenta-se significativamente estruturada entre e dentro das subpopulações, com base nos locos microssatélites genômicos e cloroplastidiais analisados.
- Em escala local a migração via pólen apresentou-se mais efetiva para o fluxo gênico total, em relação à migração via semente, para a espécie *D. alata*.
- Em escala regional a migração via semente contribuiu mais efetivamente para o fluxo gênico total, em relação à migração via pólen, para a espécie *D. alata*.
- Existe padrão espacial na variabilidade genética entre e dentro das subpopulações, com base nos locos microssatélites genômicos e cloroplastidiais, sugerindo que esta estruturação tenha se originado pelo modelo de fluxo gênico “alondras” ou “isolamento por distância”.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. A.; COSTA, T. S. A.; SILVA, J. A. S. Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**, Brasília: Embrapa, 2008, v. 1, p. 351-381.
- ALMEIDA, S. P. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998, p. 156-161.
- ANDERSON, R. P.; MARTINEZ-MEYER E. Modeling species' geographic distributions for preliminary conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. **Biological Conservation**, Oxford, v. 116, n. 2, p. 167-179, 2004.
- APARICIO, S.; CHAPMAN, J.; STUPKA, E. et al. (41 co-autores). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. **Science**, Washington D.C., v. 297, p. 1301-1310, 2002.
- ARAUJO, M. B.; NEW, M. Ensemble forecasting of species distributions. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 22, n. 1, p. 42-47, 2007.
- ARNAUD-HAOND, S.; TEIXEIRA, S.; MASSA, S. I.; BILLOT, C.; SAENGER, P.; COUPLAND, G.; DUARTE, C. M.; SERRÃO, E. A. Genetic structure at range edge: low diversity and high inbreeding in Southeast Asian mangrove (*Avicennia marina*) populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3515-3525, 2006.
- ASSINE, M. L.; SOARES, P. C. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. **Quaternary International**, Edmonton, v. 114, n. 1, p. 23-34, 2004.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 2004.
- AZEVEDO, V. C. R.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic Structure and Mating System of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a Heavily Logged Amazonian Timber Species. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 98, n. 7, p. 646-654, 2007.

- AZEVEDO, V. C. R.; KANASHIRO, M.; GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A. Y. Variabilidade no cpDNA em *Manilkara huberi*, espécie sob manejo sustentável na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 859-867, 2008.
- BARBERI, M.; LIMA-RIBEIRO, M. S. Evolução da Paisagem nas Áreas de Cerrados: Uma análise no tempo profundo. In: GOMES, H. (Org). **Universo do Cerrado**. Goiânia: EDUCG, 2008, p. 15-78.
- BARNETT, R.; YAMAGUCHI, N.; BARNES, I.; COOPER, A. The origin, current diversity and future conservation of the modern lion (*Panthera leo*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, London, v. 273, p. 2119-2125, 2006.
- BASSINI, F. **Estrutura e dinâmica populacional de *Dipteryx alata* Vog. (barueiro): implicações para a conservação, extrativismo e cultivo**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- BAWA, K. S. Breeding systems of trees in a tropical wet forest. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 17, p. 521-521, 1979.
- BEHLING, H.; HOOGHMESTRA, H. Neotropical savanna environments in space and time: late Quaternary interhemispheric comparison. In: MARKRAF V., (Ed.) **Interhemispheric climate linkages**. New York, NY: Academic Press, 2001, p. 307-323.
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, 580-591, 2007.
- BLAIR, M. W.; GIRALDO, M. C.; BUENDÍA, H. F.; TOVAR, E.; DUQUE, M. C.; BEEBE, S. E. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 113, p. 100-109, 2006.
- BONACCORSO, E.; KOCH, I.; PETERSON, A. T. Pleistocene fragmentation of Amazon species' ranges. **Diversity and Distributions**, Oxford, v.12, p.157-164, 2006.
- BORCARD, D.; LEGENDRE, P. All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. **Ecological Modelling**, Copenhagen, v.153, p.51-68, 2002.
- BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata* Vogel (baru). **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 009-018, 2000.

- BRIDLE, J. R.; VINES, T. H. Limits to evolution at range margins: when and why does adaptation fail? **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 22 n. 3, p. 140-147, 2007.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 2007.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 816-827, 1998.
- BULHÃO, C. F.; FIGUEIREDO, P. Fenologia de leguminosas arbóreas em uma área de Cerrado marginal no nordeste do Maranhão. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 361-369, 2002.
- BURCZYK, J.; ADAMS, W. T.; BIRKES, D. S.; CHALUPKA, W. Using genetic markers to direct estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. **Genetics**, Baltimore, v. 173, p. 363-372, 2006.
- BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? **Forest Genetics**, Zvolen, v. 11, p. 1-14, 2004.
- CAVERS, S.; DEGEN, B.; CARON, H.; LEMES, M.R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A.J. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, London, v. 95, p. 281-289, 2005.
- CIAMPI, A. Y.; VINSON, C. C.; GAIOTTO, F. A. Estimativa da diversidade genética em arbóreas nativas tropicais utilizando microssatélites. In: NASS, L. L. (ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, p. 421-440, 2007.
- COELHO, A. S. G. **Abordagem bayesiana na análise genética de populações utilizando dados de marcadores moleculares**. 2002. 76f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, Oxford, n. 12, p. 105-115, 2003.

- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, Oxford, n. 10, p. 349-356, 2001.
- CORREA, G. C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R. Germinação de sementes e emergência de plântulas de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nos cerrados do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 2, p. 17-23, 2000b.
- CORREA, G. C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R.; CHAVES, L. J.; BORGES, J.D. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), CAJUZINHO (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 24, n. 4, p. 42-47, 2008.
- CORREA, G. C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R.; ZICA, L. F. Caracterização física de frutos de baru (*Dipteryx alata* Vog.) em três populações nos cerrados do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 2, p. 5-11, 2000a.
- CRESTE, C.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 19, p. 299-306, 2001.
- DEGEN, B. **SGS: spatial genetic software**. Computer program and user's manual. 2000. Disponível em: <<http://kourou.cirad.fr/genetique/software.html>>. Acesso em 31 de outubro de 2005.
- DEGEN, B.; BANDOUE, E.; CARON, H. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. **Heredity**, London, v. 93, p. 585-591, 2004.
- DEGEN, B.; CARON, H.; BANDOUE, E.; MAGGIA, L.; CHEVALLIER, M. H.; LEVEAU, A.; KREMER, A. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. **Heredity**, London, v. 87, p. 497-507, 2001.
- DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT R. J. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 1, p. 20-33, 2008.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; BINI, L. M. Modelling geographical patterns in species richness using eigenvector-based spatial filters. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 14, p. 177-185, 2005.

- DINIZ-FILHO, J. A. F.; BINI, L. M.; HAWKINS, B. A. Spatial autocorrelation and red herrings in geographical ecology. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 53-64, 2003.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; FUCHS, S.; ARIAS, M. C. Phylogeographic autocorrelation of phenotypic evolution in honey bees (*Apis mellifera*). **Heredity**, London, v. 83, n. 6, p. 671-680, 1999.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; NABOUT, J. C.; BINI, L. M.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. C.; de MARCO JR, P.; COLLEVATTI, R. G. Niche modelling and landscape genetics of *Caryocar brasiliense* (Pequi tree: Caryocaraceae) in Brazilian Cerrado: an integrative approach for evaluating central peripheral population patterns. **Tree Genetics & Genomes** (Print), Berlin, v. 5, N. 4, p. 617-627, 2009a.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; NABOUT, J. C.; TELLES, M. P. C.; SOARES, T. N.; RANGE, T. F. L. V. B. A review of techniques for spatial modeling in geographical, conservation and landscape genetics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 2, p. 203-211, 2009b.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; SANT'ANA, C. E. R.; BINI, L. M. An eigenvector method for estimating phylogenetic inertia. **Evolution**, Lawrence, v. 52, p. 1247-1262, 1998.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, Gainesville, v. 16, n. 4, p. 924-935, 2002.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. C.; BONATTO, S. L.; EIZIRIK, E.; FREITAS, T. R. O.; MARCO, P.; SANTOS, F. R.; SOLE-CAVA, A.; SOARES, T. N. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 35, p. 753-763, 2008.
- ECKERT, C. G.; SAMIS, K. E.; LOUGHEED, S. C. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1170-1188, 2008.
- EDH, K.; WIDÉN, B. AND CEPLITIS A. Nuclear and chloroplast microsatellites reveal extreme population differentiation and limited gene flow in the Aegean endemic *Brassica cretica* (Brassicaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 4972-4983, 2007.
- ELITH, J.; GRAHAM, C. H.; ANDERSON, R. P.; DUDIK, M.; FERRIER, S.; GUISAN, A.; HIJMANS, R. J.; HUETTMAN, F.; LEATHWICK, J. R.; LEHMANN, A.; LI, J.; LOHMANN, L.; LOISELLE, B. A.; MANION, G.; MORITZ, C.; NAKAMURA, M.;

- NAKAZAWA, Y.; OVERTON, J. M.; PETERSON, A. T.; PHILLIPS, S.; RICHARDSON, K.; SCHACHETTI PEREIRA, R.; SCHAPIRE, R. E.; SOBERÓN, J.; WILLIAMS, S. E.; WISZ, M.; ZIMMERMANN, N. E. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. **Ecography**, Copenhagen, v. 29, p. 129-151, 2006.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 435-445, 2004.
- EMBRAPA: O Cerrado brasileiro. Disponível em <<http://cerradobrasil.cpac.embrapa.br/>>. Acesso em 05 de novembro de 2005.
- ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v. 72, p. 250-259, 1994.
- EPPERSON B. K. Multilocus estimation of genetic structure within populations. **Theoretical Population Biology**, Stanford, v. 65, p. 227-237, 2004.
- EPPERSON, B. K. Gene Dispersal and Spatial Genetic Structure. **Evolution**, Lawrence, v. 51, n. 3, p. 672-681, 1997.
- EPPERSON, B. K. **Geographical genetics**. New Jersey: Princeton University Press, (Monographs in Population Biology, 38), 2003.
- EPPERSON, B. K. Spatial genetic structure and non-equilibrium demographics within plant populations. **Plant Species Biology**, Sapporo, v. 15, p. 269-279, 2000.
- ESCUADERO, A.; IRIONDO, J. M.; TORRES, E. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. **Biological Conservation**, Oxford, v. 113, p. 351-365. 2003.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, New Zealand, v. 1, p. 47-50, 2005.
- FARBER, O.; KADMON, R. Assessment of alternative approaches for bioclimatic modeling with special emphasis on the Mahalanobis distance. **Ecological Modelling**, Copenhagen, v. 160, p. 115-130, 2003.
- FELFILI, J. M.; RIBEIRO, J. F.; BORGES FILHO, H. C.; VALE, A. T. Potencial econômico da biodiversidade do Cerrado: estágio atual e possibilidades de manejo sustentável dos recursos da flora. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. (Eds.) **Cerrado: ecologia e caracterização** Embrapa Cerrados: Planaltina, Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2004, p. 177-220.



- FENSTER, C. B.; VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). **Evolution**, Lawrence, v. 57, p. 995-1007, 2003.
- FERREIRA, M. B.; CUNHA, L. H. S. Dispersão de Plantas lenhosas de cerrado – germinação e desenvolvimento. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 6, n. 6, p. 27-32, 1980.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: Embrapa - Cenargen, 1998, 220 p.
- FERREIRA, R. A.; BOTELHO, S. A.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Caracterização morfológica de fruto, semente, plântula e muda de *Dipteryx alta* Vogel – Baru (Leguminosae Papilionoideae). **Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 73-87, 1998.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: SBG -Sociedade Brasileira de Genética, 2008, 280p.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2ª. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, cap.4, p.86-125, 1992.
- GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 2128-2136, 2002.
- GAO, L.; TANG, J.; LI, H.; JIA, J. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 12, p. 245-261, 2003.
- GARCIA, R. A. V.; BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V. Caracterização Molecular e análise de transferibilidade de marcadores microssatélites em leguminosas. In: **Anais do 53º Congresso Brasileiro de Genética**, Ribeirão Preto: SBG, 2007.
- GARNER, T. W. J.; PEARMAN, P. B.; ANGELONE, S. Genetic diversity across a vertebrate species' range: a test of the central-peripheral hypothesis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 1047–1053, 2004.
- GASTON, K. J. **The Structure and dynamics of geographic ranges**. Oxford University Press, Oxford, 2003.
- GASTON, K. J.; BLACKBURN, T. M. **Pattern and process in macroecology**. Blackwell, London, 2000.
- GINZBURG, L. R.; GOLENBERG, E. M. **Lectures in Theoretical Population Biology**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1985.

- GOLDSTEIN, B. D.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, UK, 2001.
- HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, p. 323-335, 2004.
- HARDESTY, B.D.; DICK, C.W.; KREMER, A.; HUBBELL, S.; BERMINGHAM, E. Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. **Heredity**, London, v. 95, p. 290-297, 2005.
- HARDY, O. J. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 1577-1588, 2003.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618-620, 2002.
- HARRIS, S. A.; ROBINSON, J. P.; JUNIPER, B. E. Genetic clues to the origin of the apple. **Trends in Genetics**, London, v. 18, p. 426-430, 2002.
- HAWKINS, B. A.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; BINI, L. M.; DE MARCO, P.; BLACKBURN, T. M. Red herrings revisited: spatial autocorrelation and parameter estimation in geographical ecology. **Ecography**, Copenhagen, v. 30, p. 375–384, 2007.
- HEWITT, G. M. Post-glacial re-colonization of European biota. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 68, p. 87-112, 1999.
- HEYWOOD, J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 22, p. 335-355, 1991.
- HIJMANS, R. J.; GUARINO, L.; BUSSINK, C.; BARRANTES, I.; ROJAS, E. **DIVA-GIS**, Version 5.2., 2005. Disponível em: <<http://www.diva-gis.org>> Acesso em: 14 de julho de 2008.
- HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematic**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.
- HOLDEREGGER, R.; WAGNER, H. H. A brief guide to Landscape Genetics. **Landscape Ecology**, Dordrecht, v. 21, n. 6, p. 793-796, 2006.
- HOLDEREGGER, R.; WAGNER, H. H. Landscape Genetics. **Bioscience**, Washington D.C., v. 58, p. 199- 208, 2008.

- HOPPER, S. D.; GIOIA, P. The Southwest Australian floristic region: evolution and conservation of a global hot spot of biodiversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 35: p. 623–650, 2004.
- HOWES, B. J.; LOUGHEED, S. C. Genetic diversity across the range of a temperate lizard. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 1269-1272, 2008.
- HUTCHISON, C. A. III. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 6227-6237, 2007.
- JOHANSSON, M.; PRIMMER, C. R.; MERILA, J. History vs. current demography: explaining the genetic population structure of the common frog (*Rana temporaria*). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 975-983, 2006.
- JONES, A. G.; ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 2511-2523, 2003.
- JUMP, A. S.; PEÑUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D.C., v. 103, p. 8096-8100, 2006.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.
- KASHI, Y.; KING, D. G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends in Genetics**, London, v. 22, p. 253-259, 2006.
- KIMURA, M.; WEISS, G. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, Baltimore, v. 49, p. 561-576, 1964.
- KIRKBRIDE JR, J. H.; GUNN, C. R.; WEITZMAN A. L. Fruits and Seeds of Genera in the Subfamily Faboideae (Fabaceae). **Technical Bulletin**, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, v.1, n.1890, 2003. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/np/FruitsSeeds/FS1-00Front.pdf>>. Acesso em: 23 de dezembro de 2008.
- KLINK C. A.; MOREIRA, A. G. Past and current human occupation, and land use. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Eds). **The Cerrados of Brazil**. Columbia University Press, New York, 2002, p. 69-88.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A Conservação do Cerrado. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, p. 147-155, 2005.

- LACERDA, A. E. B.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A. M. Effects of Reduced Impact Logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 1034-1043, 2008b.
- LACERDA, A. E. B.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A. M. Long-pollen Movement and Deviation of Random Mating in a Low-density Continuous Population of a Tropical Tree *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, Zurich, v. 40, n. 4, p. 462-470, 2008a.
- LATOUCHE-HALLE, C.; RAMBOER, A.; BANDO, E.; CARON, H.; KREMER, A. Nuclear and chloroplast genetic structure indicate fine-scale spatial dynamics in a neotropical tree population. **Heredity**, London, v. 91, p. 181-190, 2003.
- LEDRU, M. P. Late Quaternary history and evolution of the cerrados as revealed by palynological records. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Eds) **The Cerrados of Brazil**. Columbia University Press, New York, 2002, p. 35-50.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE L. **Numerical ecology**. Elsevier, Amsterdam, 1998.
- LEVIN, S. A.; MULLER-LANDAU, H. C.; NATHAN, R.; CHAVE, J. The ecology and evolution of seed dispersal: a theoretical perspective. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 34, p. 575-604, 2003.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **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>, 2001.
- LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 2453–2465, 2002.
- LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, p. 991-1007, 2004.
- LINCOLN, S. E.; DALY, M. J.; LANDER, E. S. **“Primer” software**. Available from E. Lander, Whitehead Institute, Cambridge, MA, 1991.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992.

- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.
- MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. **Conservação Internacional**, Brasília, DF, 2004.
- MADALENA, C. R. G. **DNA repetitivo e seu papel na estrutura cromossômica terminal de *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae)**. 2008. 181f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- MANEL, S.; SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 18, n. 4, p. 189-197, 2003.
- MANLY, B. F. J. Randomization and regression methods for testing for associations with geographical, environmental and biological distances between populations. **Researches on Population Ecology**, Kyoto, v. 28, p. 201-218, 1986.
- MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado, **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 7, p. 957-969, 2006.
- MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001, p.153-161.
- MAURER, B. A. **Geographical population analysis: tools for the analysis of biodiversity**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994.
- MELHEM, T. S. A entrada de água na semente de *Dipteryx alata* Vog. **Hoehnea**, São Paulo, v. 4, p. 33-48, dez., 1974b.
- MELHEM, T. S. Desenvolvimento da plântula de *Dipteryx alata* Vog. (Leguminosae-Lotoideae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 5, p. 91-121, dez., 1975b.
- MELHEM, T. S. Fisiologia da germinação das sementes de *Dipteryx alata* Vog. (Leguminosae-Lotoideae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 5, p. 59-90, dez., 1975a.
- MELHEM, T. S. Morfologia e anatomia da unidade de dispersão de *Dipteryx alata* Vog. **Hoehnea**, São Paulo, v. 4, p. 13-31, dez., 1974a.

- MELO, J. T.; TORRES, R. A. A.; SILVEIRA, C. E. S. CALDAS, L. S. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Plantas do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**, Brasília: Embrapa, 2008, v. 1, p. 319-350.
- MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora Vascular do Bioma Cerrado: Checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**, Brasília: Embrapa, 2008, v. 2, p. 421-442.
- MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; RESENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: Ambiente e Flora**. Planaltina: Embrapa/CPAC, p. 289-539, 1998.
- MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; DIVERSIDADE E Estrutura genética espacial em duas Populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.2, p.281-289, 2005.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. DA.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, fev. 2000.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D.C., v. 70 n. 12 p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a samall number of individual. **Genetics**, Baltimore, n. 89, p. 583-590, 1978.
- NÉRI, P. **Castanha de baru amplia renda no Cerrado**. Texto no site da Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária-BA (2004) Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping&notid=1466>. Acesso em 24 de maio de 2007.
- ODDOU-MURATORIO, S.; PETIT, R. J.; GUERROUÉ, L. E.; GUESNET, D.; DEMESURE, B. Pollen-vs. seed-mediated gene flow in a scattered forest tree species. **Evolution**, Lawrence, v. 55, 1123–1135, 2001.

- OLIVEIRA, A. N.; SILVA, A. C.; ROSADO S. C. S.; RODRIGUES, E. A. C. Variações genéticas para características do sistema radicular de mudas de baru (*Dipteryx alata* Vog.) **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 905-909, 2006.
- OLIVEIRA, E. J.; PADUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 294-307, 2006.
- OLIVEIRA, M. E. de. **Influência de árvores das espécies nativas *Dipteryx alata* Vog. e *Caryocar brasiliense* Camb. no sistema solo-planta em pastagem de *Brachiaria decumbens* Stapf no Cerrado**. 1999. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, 1999.
- OLIVEIRA-FILHO A. T.; RATTER J. A. Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado Biome. In: OLIVEIRA P.S.; MARQUIS, R.J. (Eds.) **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**. New York, Columbia University Press, 2002, p. 91–120.
- ORTIZ, L. S. (coord.) **Energias renováveis sustentáveis: uso e gestão participativa no meio rural**. Porto Alegre : Núcleo Amigos da Terra/Brasil, 2005. Cartilha disponível em: <http://www.inga.org.br/forum/cartilha.html>. Acesso em 24 de maio de 2007.
- PAULA, J. E. Caracterização anatômica de madeiras nativas do cerrado com vistas à produção de energia. **Cernea**, Lavras, v.5, n.2, p.26-40, 1999.
- PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond F-ST: Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 5, n. 5, p. 585-602, 2004.
- PERES-FILHO, O.; DORVAL, A. Insetos visitantes de flores de Cambarú (*Dipteryx alata* Vog.) (Leguminosae, Papilionoideae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15, ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, VI, SIMPÓSIO INTEGRADO DE MANEJO DE PRAGAS, II. 1995. Caxambú. **Anais...** Sociedade Brasileira de Entomologia, 1995.
- PETIT, R. J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI D.; VENDRAMIN, G.G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 689–701, 2005.
- PETIT, R. J.; PINEAU, E.; DEMESURE, B.; BACILIERI, R.; DUCOUSSO, A.; KREMER, A. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D.C., v. 94, p. 9996–10001, 1997.

- PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, Copenhagen, v. 190, p. 231-259, 2006.
- PHILLIPS, S.; DUDÍK, M. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. **Ecography**, Copenhagen, v. 31, p. 161–175, 2008.
- PONS, O.; PETIT, R. J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered vs. unordered alleles. **Genetics**, Baltimore, v. 144, p. 1237- 1245, 1996.
- PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 16, n. 3, p. 142-147, 2001.
- PUJOL, B.; PANNELL, J. R. Reduced Responses to Selection After Species Range Expansion. **Science**, Washington D.C., v. 321, p. 96, 2008.
- RAMOS, A. C. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. A.; SANTOS, F. R.; LOVATO, M. B. Phylogeography of the Tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the Influence of Quaternary Climate Changes in the Brazilian Cerrado. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 1219–1228, 2007.
- RANGEL, T. F. L. V. B.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; BINI, L. M. Towards an integrated computational tool for spatial analysis in macroecology and biogeography. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 15, p. 321–327, 2006.
- RIBEIRO, J. F.; SANO, S. M.; BRITO, M. A.; FONSECA, C. E. L. **Baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. Jaboticabal: Funep, (Série Frutas Nativas, 10), 2000, 41 p.
- RIBEIRO, J. F.; SILVA, J. C. S. Manutenção e recuperação da biodiversidade do bioma Cerrado: o uso de plantas nativas. In: 8º Simpósio sobre o Cerrado: Biodiversidade e produção sustentável de alimentos e fibras nos Cerrados e proceedings do 1st International Symposium on Tropical Savannas: biodiversity and sustainable production of food and fibers in the Tropical Savannas 1996. Planaltina: Embrapa-CPAC, **Anais...**, p. 10-14. 1996.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As Matas de Galeria no contexto do bioma Cerrado. In: RIBEIRO, J. F.; FONSECA C. E. L. da; SOUSA-SILVA, J. C. (Ed.). **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. cap. 1, p 28-47.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado: Ambiente e Flora**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998. p 87-166.



- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using  $n$  independent loci. **Heredity**, London, v. 47, p. 35-52, 1981.
- RIZZINI, C. T. A flora do Cerrado. In: FERRI, M.G. (Ed.) **Simpósio sobre o Cerrado**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1963, p. 125-177.
- ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS E.C. (Ed.) **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa:UFV, 2006, p.329-380.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System** (software). New York: Exeter publishers, 1986-1998.
- SAGARIN, R. D.; GAINES, S. D. The ‘abundant centre’ distributions: to what extent is it a biogeographical rule? **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, p. 137–147, 2002.
- SAGARIN, R. D.; GAINES, S. D.; GAYLORD, B. Moving beyond assumptions to understand abundance distributions across the range of species. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 21, n. 9, p. 524-530, 2006.
- SALGADO-LABOURIAU, M. L.; BARBERI, M.; FERRAZ-VICENTINI, K. R.; PARIZZI, M. G. A dry climatic event during the late Quaternary of tropical Brazil. **Review of Paleobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 99, p. 115-129, 1998.
- SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J.F., MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 201-210, 2004.
- SAMBROOK, L. B.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANDERSON, E. W.; JAITEH, M.; LEVY, M. A.; REDFORD, K.H.; WANNEBO A.V.; WOOLMER, G. The human footprint and the last of the wild. **Bioscience**, Washington D.C., v. 52, p. 891-904, 2002.
- SANO, S. M. **Ecofisiologia do crescimento inicial de *Dipteryx alata* Vog. (Leguminosae)**. 2001. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2001.
- SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**, Brasília: Embrapa, 2008, v. 1 e 2.
- SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. de. **Baru: biologia e uso**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. 52p.

- SANO, S. M.; VIVALDI, L. J.; SPEHAR, C. R. Diversidade morfológica de frutos e sementes de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 513-518, 1999.
- SAWYER, D. Climate change, biofuels and eco-social impacts in the Brazilian Amazon and Cerrado. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 363, p. 1747-1752, 2008.
- SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2005.
- SEGURADO, P.; ARAUJO, M. B. An evaluation of methods for modelling species distributions. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 1555-1568, 2004.
- SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Oxford, v. 9, p. 615-629, 2006.
- SERENO, M. J. C.; WIETHOLTER, P.; TERRA, T. F. Domesticação das plantas – a síndrome que deu certo. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. (Org.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, cap.2, p. 38-58.
- SHARMA, P. C.; GROVER, A.; KAHL, G. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. **Trends in Biotechnology**, London, v. 25, p. 490-498, 2007.
- SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 1135-1145, 2008.
- SILVA, A. K.; EGITO, M. Rede de Comercialização Solidária de Agricultores Familiares e Extrativistas do Cerrado: um novo protagonismo social. **Agriculturas**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 14-16, 2005.
- SIQUEIRA, A. C. M. F.; NOGUEIRA, J. C. B.; KAGEYAMA, P. Y. Conservação dos recursos genéticos ex situ do cumaru (*Dipteryx alata*) Vog. Leguminosae. **Revista do Instituto Florestal**, v. 5, n. 2, p. 231-243, 1993.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Baltimore, v. 139, p. 457-462, 1995.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, Washington D.C., v. 236, p. 787-792, 1987.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, Lawrence, v. 39, p. 53-65. 1985.

- SLATKIN, M.; BARTON, N. H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, Lawrence, v. 43, p. 1349–1368, 1989.
- SOARES JÚNIOR, M. S.; CALIARI, M.; TORRES, M. C. L.; VERA, R.; TEIXEIRA, J. S.; ALVES, L. C. Qualidade de biscoitos formulados com diferentes teores de farinha de amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n.1, p. 51-56, 2007.
- SOARES, T. N. **Estrutura e padrão espacial da variabilidade genética de *Dipteryx alata* Vogel (barueiro) no Cerrado**. 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.
- SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; TELLES M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; RESENDE, L.V. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, Dordrecht, v. 132, n. 1, p. 9-19, 2008a.
- SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; RESENDE, L. V. Distribuição espacial da variabilidade genética intrapopulacional de *Dipteryx alata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1151-1158, 2008b.
- SOARES, T. N.; RESENDE, L. V.; MELO, D. B. ; BRONDANI, R. P. V.; TELLES, M. P. C.; BORBA, T. C. O.; CHAVES, L. J. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Anais...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008c. CD-ROM.
- SOARES, T. N.; TELLES, M. P. C.; CHAVES, L. J. Contribuições da Genética Molecular para a conservação e uso de espécies frutíferas nativas do Cerrado. In: GOMES, H. (Ed.) **Universo do Cerrado**. 1 ed. Goiânia: UCG, 2008d. v. 2, p. 397-442.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001, p. 172-192.
- SORK, V. L.; NASON, J.; CAMPBELL, D. R. FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 14, p. 219–224, 1999.
- SOULÉ, M. The epistasis cycle: a theory of marginal populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 4, p. 165–187, 1973.
- STOCKWELL, D. R. B.; PETERS, D. The GARP modeling system: Problems and solutions to automated spatial prediction. **International Journal of Geographical Information Science**, Abingdon, v. 13, p. 143-158, 1999.

- TAKEMOTO, E.; OKADA, I. A.; GARBELOTTI, M. L.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 113-117, 2001.
- TEIXEIRA, S. M.; ANTONINI, I. M.; KRATZ, A. C. A. **Programa Goiano de Biodiesel: Estratégia para a edificação do programa estadual de Bioenergia**. (2006) Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/ProgramaGoiano13.pdf>. Acesso em 24 de maio de 2007.
- TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; BASTOS, R. P.; SOARES, T. N.; GUIMARÃES, L.D.; LIMA, L. P. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. **Biological Conservation**, Oxford, v. 139, p. 37-46, 2007.
- TORRES, G. A. **Morfologia e aspectos evolutivos dos cromossomos mitóticos de Baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 2001. 97f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- TOTH, G.; SPARI Z, G.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, New York, v. 10, p. 967-981, 2000.
- TRAKHTENBROT, A.; NATHAN, R.; PERRY, G.; RICHARDSON, D. M. The importance of long-distance dispersal in biodiversity conservation, **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 11, p. 173-181, 2005.
- TSOAR, A.; ALLOUCHE, O.; STEINITZ, O.; ROTEM, D.; KADMON, R. A comparative evaluation of presence-only methods for modelling species distributions. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 397-405, 2007.
- VAN OPPEN, M. J. H.; RICO, C.; TURNER, G. F.; HEWITT, G. M. Extensive Homoplasy, Nonstepwise Mutations, and Shared Ancestral Polymorphism at a Complex Microsatellite Locus in Lake Malawi Cichlids. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 489-498, 2000.
- VAN ROSSUM F.; PRENTICE, H.C. Structure of allozyme variation in Nordic *Silene nutans* (Caryophyllaceae): population size, geographical position and immigration history. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 81, p. 357–371, 2004.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O.J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant population. **Molecular Ecology**, Oxford, v.13, p. 921-935, 2004.

- VENCOVSKY, R.; NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A. J. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**, cap 7, p. 231-280, 2007.
- VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; SUTTON, G.G.; KERLAVAGE, A.R.; SMITH, H.O.; HUNKAPILLER M. Shotgun sequencing of the human genome. **Science**, Washington D.C., v. 280, p. 1540–1542, 1998.
- VUCETICH, J. A.; WAITE, T.A. Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: null hypotheses for landscape conservation genetics. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 4, p. 639-645, 2003.
- WANG, F-Y.; GE, X-J.; GONG, X.; HU, C-M.; HAO, G. Strong Genetic Differentiation of *Primula sikkimensis* in the East Himalaya–Hengduan Mountains. **Biochemical Genetics**, New York, v. 46, p. 75–87, 2008.
- WARD, M.; DICK, C. W.; GRIBEL, R.; LOWE, A. J. To self, or not to self. . . A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in Neotropical trees. **Heredity**, London, v. 95, p. 246-254, 2005.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- WEISING, K.; GARDNER, R. C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genome of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 9–19, 1999.
- WRIGHT, S. The genetical structure of population. **Annals of Eugenics**, Oxford, v. 15, p. 395-420, 1951.
- WRIGTH, S. Isolation by distance. **Genetics**, Baltimore, v. 28, p. 114-138, 1943.
- ZANE, L, BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1–16, 2002.
- ZUCCHI, M.; BRONDANI, R. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

## **APÉNDICE**

**Apêndice A.** Relação dos marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *Dipteryx alata* a partir de uma biblioteca genômica “shotgun”. Em negrito estão os locos que já foram testados os demais estão em fase de teste.

Loco	Iniciador-forward (F)	Tm	Iniciador-reverse (R)	Tm	Motivo	Nº repetições (pb)	Tam. produto (pb)
Da_E01	ATTGGGCCCTAGCATACAAG		GTCACGTATGGCCTTCCACC				188
Da_E02	GGGCCCTAGCATACAAGGTT	60,3	TAGTTGCCCTTTGTATCGG	60,0	TA	49	177
Da_E03	ATGAATCATCCTTTCCACGG	59,8	GGATAATGGTAACCCCATCG	59,0	ATAA	13	147
Da_E04	CCCGGTTGATCCGATAAATA	59,6	TTTTGCATACTAAACCCCG	59,8	TA	11	200
Da_E05	TACCGGTGGATCCGATTA	60,1	GAGGAGACACCAAGGTCAGC	59,8	TTC	19	273
Da_E06	TGCAGCATAAAAATTGCGAA	60,3	TTACCCCAAAGCCTCAAGAA	59,7	AAAT	17	216
Da_E07	ACTGGCCAATCATTACACA	60,0	AACCATTTCAGGAAAATTTGA	57,7	TA	37	380
Da_E08	ACCATTTCACCGAAAGCAC	60,0	GCCAGCTGGAAGCACTTATC	60,0	TA	11	192
Da_E09	CCAGGAATCCAATCTAACGC	59,5	AACTGAGAGATCCCAGATTCC	58,7	TTTGG	18	136
Da_E10	TGGATTTGGTTTGGTTTGGT	60,1	CTCATTCTCTCTCACACTCTCCC	59,5	AT	47	174
Da_E11	AAAGGGGTGCCTAACAAAA	58,6	CGTTTTGTCCGTTTCATGTG	60,0	AATT	13	157
Da_E12	CCTTCTATGCGCTCTCTGCT	59,9	TACTTCAACGCCAGCTTCCT	60,0	ATTTTT	18	220
Da_E13	TGCAGCATAAAAATTGCGAA	60,3	TTACCCCAAAGCCTCAAGAA	59,7	AAAT	17	216
Da_E14	CACATTCATTAAGAGGGAATAACC	59,2	CCTTTTGAAACCATTTTGGC	60,7	AT	40	128
Da_E15	TACCTCAACTGAAATCGGGG	59,9	TGGCCATGAGTTATGACTACGA	60,5	TAAGC	20	197
Da_E16	GGGCCCTAGCATACAAGGTT	60,3	TAGTTGCCCTTTGTATCGG	60,0	TA	49	177
Da_E17	ATGAATCATCCTTTCCACGG	59,8	GGATAATGGTAACCCCATCG	59,0	ATAA	13	147
Da_E18	CCCGGTTGATCCGATAAATA	59,6	TTTTGCATACTAAACCCCG	59,8	TA	11	200
Da_E19	TCCAAAGATCTTGTGCTATCCA	59,7	GAGGAGACACCAAGGTCAGC	59,8	TTC	19	204
Da_E20	ACCATTTCACCGAAAGCAC	60,0	GCCAGCTGGAAGCACTTATC	60,0	TA	11	192
Da_E21	TTGAGAATGGTGATTATGGGC	59,8	GAGCTGTTTTCCATGTTTCCA	60,1	TG	11	107
Da_E22	CTACCGGGGATCCGATAAGT	60,2	CCAAGGACCTTCACCATCAT	59,8	TA	13	451
Da_E23	TCCGATCTTTCACCGAAC	60,2	GGTGGCCAACACTAAGAACC	59,5	CT	50	199
Da_E24	AAAGCCGATGGTGCAGTAAC	60,1	CCTACCTCCTTCTGACCCC	59,9	ATTG	14	110
Da_E25	AATAGCAGGGCACCATTCAC	60,0	ACGTTTTTGCCGACATTCAT	60,4	AG	17	154
Da_E26	GGGGATCCGATGAGAAATA	58,8	CGTTTTGTCCGTTTCATGTG	60,0	AATT	13	195
Da_E27	CCTTCTATGCGCTCTCTGCT	59,9	TACTTCAACGCCAGCTTCCT	60,0	ATTTTT	18	220
Da_E28	GAATTCGAGCTCGGCCAC	61,9	TGTGTCAATGATCCGCATT	59,9	TTATT	22	327
Da_E29	TGAATTCGAGCTCGGTCAC	59,9	TCCGATCAAATTAGTCCCC	60,0	AAATAT	20	327
Da_E30	GGGAGAAGGGCCATAAAGAC	59,9	CCTTCTTCTCTCTCTCTCTCTC	59,2	AGA	14	94
Da_E31	TCTTGAGGATCACGTGCAAA	60,4	CATAAAGATCGACTTGCCCTG	59,7	AATA	15	139
Da_E32	CGGTTACCTGATCTCATGAATGT	60,3	CAATTGGATGGGGATTCACT	59,6	AATAT	15	295
Da_E33	CTCGGCCACCGTATTATCC	60,3	ATGCTCCAACTCCTTCCTT	60,1	TAAAAT	19	505
Da_E34	GGCAAGGAGAACCTACACCA	60,1	CACCTTCCCTTTTCCCTTCC	59,9	AG	11	231
Da_E35	GTCATCCGATTCTCACGGTT	59,9	TCCATTACAAAAGGGGCAAC	59,8	TTC	16	531
Da_E36	ACCGGGTGATCCGATGTAT	60,0	TTTTTCACATGATTATTAGCCTTTTT	59,8	AAAAAT	23	422
Da_E37	TCCAACCGAAACCATCTAGC	60,1	GGATACCGCATGAGTTGCTT	60,1	AT	13	327
Da_E38	AAGCAATGCGTCCTTGAAGT	59,9	TCCCTCAGGTGAAATTGTGA	59,1	TA	11	288
Da_E39	CATCCACATTCGTGGTTGAG	60,0	CCTCTCCATGTCTGACCCAT	59,9	TA	23	438
Da_E40	ATCCTCTGCGTGCAATCTTT	59,8	CGCTTGCTGCTATTCCTTTC	60,1	GA	30	115
Da_E41	TTGTGTTAATGCCTTTGCCA	60,1	GCACATCATTTCCCTCCAGGT	59,9	ATAAT	15	170
Da_E42	AATGCCGTTAGCTGCTCAGT	60,0	TCCTTTTTGGGTGGTCTACG	60,0	AGC	12	81
Da_E43	CAGTGTTACCCAAATGACG	60,0	ACTGGGTGGACGTGTTTGT	60,3	AT	11	306
Da_E44	GGCAGTGTTCAAGTGCTCA	60,0	CAAAAGCTTCTGTGCCTCC	60,0	ACA	25	370
Da_E45	TCAGGTCCTAAGAGTCAAAGGG	59,7	TCCAACATTTAAGGATTTTCCA	59,7	AATA	18	463
Da_E46	GTGAATTCGAGCTCGCTACC	60,0	CCTTGCTCTACGCTATGCC	60,0	TA	25	264
Da_E47	GCCTCCTCCTCCGGTATCTA	60,6	CAGCAGTGGGAGTGTGAGAA	60,0	CA	11	123

Continua...

## Apêndice A. Continuação

Loco	Iniciador- <i>forward</i> (F)	Tm	Iniciador- <i>reverse</i> (R)	Tm	Motivo	Nº repetições (pb)	Tam. produto (pb)
Da_E48	TGGGATCCGATATGGTGTTT	60,0	TGATGTGATCATAGGCCCAA	59,9	GA	11	405
Da_E49	ACCACCCAGTTGTTAGCTGC	60,2	TATCTTGGATGGTTGCAGGC	61,0	AT	15	103
Da_E50	TGACTTGCCATTGCTCATGT	60,3	TTGGGGTATTTCAAAGAGG	58,9	GT	12	388
Da_E51	CCTACCTGGGATCCGATCTT	60,3	CAAGGATGTAGTTCTACTAGGTAAGCA	58,7	AT	17	519
Da_E52	GCATATGCGTCCTTCAGATT	59,3	TTTTGCCACATGCTTCTTTG	59,8	TTA	15	251
Da_E53	CGAATAATTGGTCTCGGGGT	61,1	GGTAAAGAAGGGCCGTAACC	59,8	TACCCG	19	140
Da_E54	ACCGTTGGATCCGATTGTAA	60,2	AAATCCATCCAAACCTCTCG	59,0	TTATT	15	392
Da_E55	AGTGAATTCGAGCTCCCGTA	59,8	TAGGTGTTGGCCAAGAAAGG	60,1	TC	27	341
Da_E56	CGATGGATCCGATTGAAGT	59,9	TTGCTCGCAAGTGGTTTATG	59,9	TA	17	251
Da_E57	TTCTCAGTGGTGTGCCATA	60,1	GATCTCGAGGAAATCCACA	60,0	CTTT	13	263
Da_E58	AATTCGAGCTCGCTACCTT	60,4	AGGTTTGCATGGGAGACAAC	60,0	TTTA	13	300
Da_E59	TCCGATTTAAACTTTCTCTCTCA	59,9	TGACAAGCTCAAAGCCAATG	60,0	TC	15	284
Da_E60	ACCTTGGATCCGATGGATTT	60,5	CAAGTGTCTTGGGTTCTTCCA	59,1	AAATTG	26	451
Da_E61	TTGGATCCGATCTTCTGCTT	59,8	AGCCTTGTTGATGGTTGGAG	60,1	CTT	26	133
Da_E62	ACCAAGCGCATGAGAGAACT	60,0	TGTTCTCGGAATCCTCATC	60,0	GAA	22	143
Da_E63	TCCGATAACGAGGGATTGAC	59,9	ATTTCCATCAGAGTGAGAAAGAA	57,1	AATTT	15	549
Da_E64	TATATGCTCCAACAACCGCA	60,1	TGGTTGTCTTTGGGTGAAC	58,4	TA	14	245
Da_E65	GGTGGATCCGATAAACCTTG	59,2	ATTCACACGCAATATGGCAA	60,0	TG	12	183
Da_E66	TTGCCATATTGCGTGTGAAT	60,0	TAGCCAACCTCATGGTCACA	60,1	AT	16	195
Da_E67	TACCACCTACCCAATCCAA	60,0	TGCATGCCCAATCATTTCTA	60,0	ATAA	13	306
Da_E68	AACAATCATGAGGCTTTGCC	60,1	ACCATCAATCCCATCTCTCG	59,9	TATT	17	208
Da_E69	TGAAATTGAGGAAGCAAGGG	60,2	TCCTTTCAATCCTTTTAGAATTTG	58,0	TC	13	208
Da_E70	GGGTGATCCGATTGAATTTT	58,7	CCAGCAAGTTCCTCCTCAAG	60,0	TTATT	17	211
Da_E71	GCAGAATCAAGGCAGTGACA	60,0	CTCCACAGGGAGACATTGGT	60,0	CAG	12	310
Da_E72	TGAATGTGGCACCATGATCT	59,9	AACCCTAACAGACTAGTATCAAGCC	58,4	AATA	18	91
Da_E73	CAGACGGACCTGAGAGAAGG	60,0	AATTGAGGCTGATGTTGGG	59,9	GATACA	24	175
Da_E74	GAATTCGAGCTCGGTCCC	60,7	TCCACGGAACCTCAAATAAA	59,4	TTA	12	342