

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DA ESTRUTURA DO HABITAT NA DIVERSIDADE GENÉTICA DO
PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense* Cambess: Caryocaraceae)**

GUSTAVO TAVARES MARTINS

Montes Claros
Junho – 2008

GUSTAVO TAVARES MARTINS

**EFEITOS DA ESTRUTURA DO HABITAT NA DIVERSIDADE GENÉTICA DO
PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense* Cambess: CARYOCARACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia e Conservação, da Universidade Estadual de Montes Claros, como requisito obrigatório para a obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas.

Montes Claros
Junho – 2008

M386e	<p>Martins, Gustavo Tavares. Efeitos da estrutura do habitat na diversidade genética do pequizeiro (<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess: Caryocaraceae) [manuscrito] / Gustavo Tavares Martins. – 2008.</p>
	57 f. : il.
	Referências : f. 50-57.
	Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia e Conservação, 2008.
	Orientador: Prof. Dr. Marcílio Fagundes.
	<p>1. <i>Caryocar brasiliense</i>. 2. Estrutura de habitat. 3. Estrutura Genética - Diversidade. 4. Gargalo genético. 5. Grau de parentesco. I. Fagundes, Marcílio. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.</p>

GUSTAVO TAVARES MARTINS

**EFEITOS DA ESTRUTURA DO HABITAT NA DIVERSIDADE GENÉTICA DO
PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense* Cambess: CARYOCARACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia e Conservação, da Universidade Estadual de Montes Claros, como requisito obrigatório para a obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 27 de junho de 2008.

BANCA EXAMINADORA

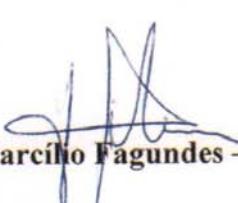
Prof. Dr. Marcílio Fagundes – Orientador
Universidade Estadual de Montes Claros

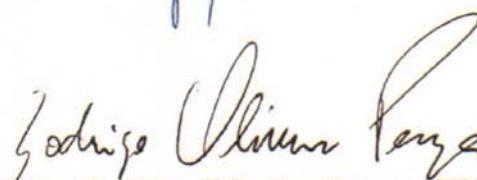
Prof. Dr. Rodrigo Oliveira Pessoa
Universidade Estadual de Montes Claros

Prof. Dr. Rosane Garcia Collevatti
Universidade Católica de Brasília



ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE GUSTAVO TAVARES MARTINS. Aos 27 dias do mês de junho 2008 (27/06/2008), às quatorze horas, reuniu-se no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual de Montes Claros a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado, indicada pelo Colegiado e composta pelos professores doutores Marcílio Fagundes, Rodrigo Oliveira Pessoa e Rosane Garcia Collevatti, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Efeitos da Estrutura do Habitat na Diversidade Genética do Pequizeiro (*Caryocar brasiliense Cambess: Caryocaraceae*)”, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Marcílio Fagundes da Universidade Estadual de Montes Claros, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regimentais para o Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Pelas indicações da Comissão o candidato foi considerado Aprovado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Montes Claros, 26 de junho de 2008


Prof. Dr. Marcílio Fagundes – Orientador- UNIMONTES


Prof. Dr. Rodrigo Oliveira Pessoa - UNIMONTES


Prof.ª Dra. Rosane Garcia Collevatti - UCB

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à mão amiga que me
amparou quando minhas pernas fraquejaram.

Em especial à minha família. A todos os que
se fazem presentes neste momento e àqueles
que por algum motivo não estão mais
conosco.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Em especial à minha família, que me apoio de modo incondicional durante minha caminhada. Ao meu Pai, meu grande amigo. À minha doce e eterna Mãe. À minha querida irmã, Cris. Ao Ito, meu grande irmão. E ao meu grande amor, Flávia.

Ao Prof. Dr. Marcílio Fagundes, mentor deste trabalho, por sua inefável perseverança. Ninguém acreditou e se dedicou tanto a este projeto. Agradeço também por sua paciência, amizade e companheirismo.

À Prof^a. Dr^a. Rosane Collevatti, por sua incomensurável qualidade profissional, sendo imprescindível para a realização deste estudo. Mas agradeço sobretudo à sua atenção, amizade, candura e compreensão.

Ao Prof. Dr. Dario Alves de Oliveira, por sua amizade e apoio incondicional. Nessa longa que estamos trilhando, esta indubitavelmente é mais uma grande conquista.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Oliveira Pessoa, por seus valiosos comentários, fundamentais para os ajustes finais deste trabalho.

À minha querida amiga Silmara, por todo o empenho durante a parte experimental deste projeto. À imensa amizade e cumplicidade que se avultaram cada vez mais em decorrência às intermináveis horas de trabalho.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Daniel Rodrigues Magalhães, por todo seu apoio, amizade e acertados conselhos nos momentos mais precisos.

Ao *amigo* Prof. Afrânio Farias, por suas preciosas dicas e sua freqüente e contínua ajuda, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros, por todo o apoio e proficiência.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação e aos amigos dos Laboratórios de Métodos Analíticos e Biologia da Conservação, pela amizade, carinho, cumplicidade e atenção.

Aos grandes amigos que fiz durante essa jornada, meus parceiros do dia-a-dia, das casas em que estive, onde se fazia da diversidade a maior expressão da igualdade. Em especial, aos meus estimados camaradas Jader, Diego, Felipe, Gustavo, Lázaro Virgílio, Rodrigo, Alex, Betinho, Alexandre, Rômulo, Diego (Fita), Ângelo, Vitor e Juliano.

À Universidade Católica de Brasília por seu apoio durante a etapa experimental.

Aos companheiros e amigos – Ida, Willian, André, Kelly, Aline, Patrícia, Natan, Virgílio, Ciro, Suellen e Dr. Renato Caparroz, que estiveram comigo e me apoiaram durante o difícil momento que estive em Brasília. Vocês foram muito importantes para o sucesso deste trabalho, fazem parte desta história e sempre estarão comigo.

E finalmente, aos meus dois grandes amigos Deusimar e Luciano, que gentilmente abriram as portas de suas vidas e me acolheram durante minha estada em Brasília.

A todos, muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil dos eletroferogramas para 10 locos de <i>Caryocar brasiliense</i>	33
Figura 2 – Freqüência de homozigotos esperados e observados para 10 locos microssatélites em <i>Caryocar brasiliense</i>	34
Figura 3 – Freqüência de diferenças do tamanho alélico (pb) esperados e observados para 10 locos microssatélites em <i>Caryocar brasiliense</i>	35
Figura 4 – Estimativa de estrutura genética de <i>C. brasiliense</i> baseado em oito locos microssatélites, assumindo K de 2 a 4 populações. As populações foram subdivididas da seguinte forma: 1=Jovens/Pastagem, 2=Jovens/Cerrado, 3=Adulto/Pastagem e 4=Adulto/Cerrado	40
Figura 5 – Distribuição das estimativas de parentesco (r_{xy}) entre pares de indivíduos de <i>C. brasiliense</i> , estimados a partir do coeficiente de Queller & Goodnight (1989).....	43
Figura 6 – Estimativas de parentesco (r_{xy}) entre pares de indivíduos de <i>C. brasiliense</i> por classes e áreas estimados a partir do coeficiente de Queller & Goodnight (1989) e distribuição de erros quasipoisson.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre os locos microssatélites de <i>Caryocar brasiliense</i> , com as respectivas amplitudes alélicas, temperaturas de hibridização (T_a) e número total de alelos por loco esperado (\hat{A}) (Collevatti et al., 1999).....	29
Tabela 2 – Caracterização genética dos 10 locos microssatélites de <i>Caryocar brasiliense</i> (N: número de indivíduos amostrados; A: número total de alelos por loco; H_{ot} : número total de alelos homozigotos observados; H_{et} : número total de alelos homozigotos esperados; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg; f: coeficiente de endocruzamento.....	36
Tabela 3 – Teste para o desequilíbrio de ligação de 10 locos de <i>C. brasiliense</i>	37
Tabela 4 – Teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg de 10 locos de <i>C. brasiliense</i>	37
Tabela 5 – Estimativas de parâmetros genéticos para duas populações de <i>C. brasiliense</i> , N: número de indivíduos amostrados; A: número médio de alelos por loco; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg; f: índice de fixação.....	38
Tabela 6 – Estimativa por bootstrapping para oito locos microssatélites de <i>C. brasiliense</i>	39
Tabela 7 – Estrutura genética de <i>C. brasiliense</i> baseada na análise da variância das freqüências alélicas e no tamanho dos alelos (R_{ST}) de oito locos microssatélites.....	39
Tabela 8 – Estrutura genética de <i>C. brasiliense</i> baseado em oito locos microssatélites.....	40
Tabela 9 – Estimativas de gargalo populacional em <i>C. brasiliense</i> , conforme o modelo “ <i>Stepwise Mutation Model</i> ” – SMM. H_e : heterozigosidade esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg; H_{eq} : heterozigosidade esperada em equilíbrio de mutação e deriva. .	41

Tabela 10 – Estimativas de gargalo populacional em <i>C. brasiliense</i> , conforme o modelo “ <i>Stepwise Mutation Model</i> ” – SMM. H_e : heterozigosidade esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg; H_{eq} : heterozigosidade esperada em equilíbrio de mutação e deriva. .42	
Tabela 11 – Proporção de indivíduos aparentados de <i>C brasiliense</i> por classe e área estimados a partir do coeficiente de Queller & Goodnight (1989).	44
Tabela 12 – Estimativa de valores-p para o grau de parentesco (r_{xy}) entre pares de indivíduos de <i>C brasiliense</i> por classes e áreas estimados a partir do coeficiente de Queller & Goodnight (1989).....	44

MARTINS, Gustavo Tavares. M.S. Universidade Estadual de Montes Claros. Junho de 2008. Efeitos da estrutura do habitat na diversidade genética do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess: Caryocaraceae). Marcílio Fagundes (orientador)

Resumo

Os marcadores moleculares têm sido cada vez mais empregados em estudos relacionados à diversidade e estrutura genética de populações. Em geral, tais estudos vêm sendo conduzidos no sentido de se quantificar a variabilidade dentro de populações e caracterizar a estrutura genética entre populações. As informações compiladas têm sido recentemente aplicadas à consolidação das bases teóricas no campo da Biologia da Conservação, sobretudo em espécies tropicais. Para isso, os principais fatores biológicos e genéticos envolvidos na constituição da diversidade e diferenciação genética têm sido constantemente considerados. Dentre os diversos fatores que ascendem sobre a diversidade e estruturação populacional de espécies arbóreas tropicais, destacam-se o tamanho populacional, fluxo gênico, sistema reprodutivo, seleção natural, fragmentação florestal, aspectos fenológicos e atividade de polinizadores e dispersores. Este trabalho teve como objetivo acrescer informações a respeito da diversidade e estrutura genética de *Caryocar brasiliense* em função da estrutura do habitat. O estudo foi conduzido em duas localidades no norte do estado de Minas Gerais, distantes aproximadamente 5 km. As estimativas de diversidade e estrutura genética da espécie foram obtidas utilizando oito locos microssatélites. Os resultados revelaram um alto nível de polimorfismo para todos os alelos observados. O índice de fixação (f) indicou uma relevante similaridade genética por classes e/ou áreas, o que sugere uma inexpressiva ocorrência de acasalamentos aleatórios dentro e entre as populações estudadas. Em todas as condições estudadas, os valores Θ nunca se revelaram estatisticamente significativos, com valores

de F sempre superiores, o que sugere uma baixa diferenciação entre populações de *C. brasiliense* devido à distribuição não aleatória dos alelos. Além disso, a uma baixa diferenciação entre populações pôde ser corroborada pela inferioridade dos valores R_{ST} em função de Θ . A avaliação da ocorrência de gargalo populacional não evidenciou efeito gargalo. Todavia, a divergência observada em relação aos pequizeiros jovens entre habitats sugere uma possível disruptão entre áreas, o que pode estar relacionada a alterações nas atividades dos polinizadores e na fenologia da planta em função da estrutura do habitat. Além disso, as estimativas de parentesco (r_{xy}) entre pares de indivíduos evidenciaram proporções mais elevadas de indivíduos geneticamente aparentados para pequizeiros jovens da área de pastagem. Esse resultado sugere a tendência do aumento de eventos endogâmicos em populações de *C. brasiliense* em áreas perturbadas, mesmo se adjacentes e relativamente próximas a populações naturais. Portanto, as populações *C. brasiliense* embora apresentem conteúdos genéticos equivalentes, devem estabelecer aumentos significativos de diferenciação genética com o decorrer de gerações, caso as estruturas dos habitats permaneçam similares aos observados.

Palavras-chave: Cerrado, *Caryocar brasiliense*, Diversidade genética, Estrutura genética, Fragmentação florestal, Estágio sucessional.

MARTINS, Gustavo Tavares. M.S. Universidade Estadual de Montes Claros. June 2008. Habitat structure effects in the genetic diversity of pequizeiro (*Caryocar brasiliense*: Caryocaraceae). Marcílio Fagundes (orientador)

Abstract

Molecular markers have been each time more used in studies related to the diversity and genetic structure population. These studies are lead with intention to quantify the inside variability and characterizing the genetic structure between populations. The information compiled has been applied to theoretical basis of Conservation Biology, over all in tropical species. For this, the main biological and genetic factors involved to constitution of the genetic diversity and differentiation has been considered. Amongst the diverse factors that happen over population diversity and structure of tropical trees enhance the population size, gene flow, mating system, cerrado selection, forest fragmentation, phenological aspects and pollination and seed dispersal activity. The aim of this work was to add more information about genetic diversity and structure from *Caryocar brasiliense* trees with different habitat structure. This study was conducted in two localities from northern Minas Gerais State, about 5 km apart one another. The genetic diversity and structure estimates had been gotten from eight microsatellite locos. The results have showed a high level of polymorphism. The fixation index (f) has showed a great genetic similarity for age class and/or areas, which has suggested inexpressive mating values between related individuals. The Θ value has never showed statistical significance, with the F value always higher, which has suggested a low differentiation among *C. brasiliense* populations. Moreover, a low differentiation among populations has been corroborated to lower R_{ST} values that Θ . It was not observed the occurrence of bottleneck event. However, observed divergence between young pequizeiros into habitats suggests a disruption of the areas, because

changing of the pollination and seed dispersal behavior and phenological patterns due to habitat structure. Moreover, the relationship estimative (r_{xy}) between pairs has evidenced higher levels of genetic related closely to young pequizeiros from pasture area. This result has suggested an inbreeding increase of the *C. brasiliense* populations in disturbed areas although located closely apart. Therefore, the populations of *C. brasiliense* in spite of show similar genetic content, they should experiment significant increasing in the levels of genetic differentiation along the future generations whether the structure habitats remain like observed.

Key Words – Cerrado, *Caryocar brasiliense*, Genetic Diversity, Genetic Structure. Gene Flow, Forest fragmentation, Sucessional stage.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Marcadores microssatélites	17
1.2	Genética e conservação de populações naturais	19
2	MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1	<i>Caryocar brasiliense</i>	27
2.2	Área de estudo	28
2.3	Extração do DNA genômico	28
2.4	Amplificação dos locos	29
2.5	Genotipagem	30
2.6	Análises estatísticas	30
2.6.1	Avaliação de erros de genotipagem	30
2.6.2	Equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação	31
2.6.3	Diversidade e estrutura genética	31
2.6.4	Gargalo populacional	32
2.6.5	Parentesco	32
3	RESULTADOS	33
3.1.1	Avaliação de erros de genotipagem	33
3.1.2	Diversidade e estrutura genética	38
3.1.3	Gargalo Populacional	41
3.1.4	Parentesco	42
4	DISCUSSÃO	46
5	CONCLUSÃO	50
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

Estudos de diversidade genética em populações naturais têm sido continuamente desenvolvidos na tentativa de se mensurar o nível de informações herdáveis em indivíduos, espécies e populações (Lowe et al., 2004). Esses estudos comumente empregam informações provenientes de marcadores moleculares para estimar os níveis de diversidade e estrutura genética para um grande número de plantas e animais (Bachmann, 1993). Além disso, o uso de marcadores moleculares tem permitido o estudo da extensão e distribuição da variação genética entre espécies e de investigações taxonômicas e evolutivas (O'Hanlon et al., 2000).

Historicamente, os marcadores moleculares tiveram seu marco em meados da década de 60 com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. Até então, todos os estudos de genética se baseavam no controle por genes associados ou em caracteres morfológicos (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Em níveis populacionais, estudos baseados na eletroforese de aloenzimas têm provido inúmeras informações sobre a variabilidade genética dentro e entre populações. Entretanto, por razões concernentes à obtenção de baixos níveis de detecção de polimorfismo ou condições de estocagem, as aloenzimas nem sempre são consideradas apropriadas para tais estudos (Scribner et al., 1994).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, foram estabelecidos métodos de detecção de polimorfismo em nível de DNA. Inicialmente, foram desenhados os marcadores RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) (Grodzicker et al., 1974) e mais recentemente técnicas baseadas na amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR – “*Polymerase Chain Reaction*”) (Mullis & Falloona, 1987). O surgimento da técnica de PCR, na década de 80, possibilitou a síntese enzimática de

milhões de cópias de determinados fragmentos de DNA. O desenvolvimento desta técnica viabilizou a concepção de diversos marcadores, como RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”) (Williams et al., 1990), AFLP (“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”) (Vos et al., 1995) e microssatélites (“*Simple Sequence Repeats*”) (Tautz, 1989). Desde então, os avanços no campo da biologia molecular vêm promovendo uma verdadeira revolução para estudos de variabilidade genética (Avise, 2004), cujos resultados contribuem expressivamente o estabelecimento de estratégias de conservação de recursos genéticos e manejo de espécies (Soulé & Wilcox, 1980a).

As informações reveladas a partir do emprego de técnicas moleculares têm fundamentado programas de conservação por fornecerem informações úteis sobre a variabilidade genética de espécies ecologicamente importantes, o que permite uma melhor compreensão de processos como dispersão e migração, história demográfica das populações, efeitos bottleneck e fundador, detecção de híbridos entre espécies, fluxo gênico e deriva gênica, filogeografia, ecologia de paisagem e ecotoxicologia (De Young & Honeycutt, 2005). Com o advento dos marcadores moleculares, inúmeros trabalhos demonstraram suas vastas aplicações em diversas espécies de plantas, eg. *Dipteryx panamensis* (Hanson et al., 2008), *Magnolia stellata* (Setsuko et al., 2007; Tamaki et al., 2008), *Quercus semiserrata* (Pakkad et al., 2008), *Cedrus libani* (Fady et al., 2008), *Pinus strobus* (Marquardt et al., 2007), *Manilkara huberi* (Azevedo et al., 2007), *Olea europaea* (Besnard et al., 2007), *Carapa guianensis* (Raposo et al., 2007), *Theobroma grandiflorum* (Alves et al., 2007), *Pinus elliottii* (Williams et al., 2007), *Magnolia obovata* (Isagi et al., 2007), *Oryza glumaepatula*, (Karasawa et al., 2007), *Dalbergia monticola* (Andrianoelina et al., 2006), *Caesalpinia echinata* (Lira et al., 2003), *Pithecellobium elegans* (Chase et al., 1996), *Carapa guianensis* (Dayanandan et al., 1999), *Neobalanocarpus heimii* (Konuda et al., 2000), *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 2001b), *Swietenia humilis* (White & Powell, 1997).

1.1 Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites têm sido apontados como marcadores extremamente poderosos, sendo notoriamente aplicados em diversas áreas do conhecimento. Dentre suas principais vantagens, destacam-se a abundância, simplicidades de execução, codominância e altos níveis de diversidade alélica. Além disso, os microssatélites são considerados bastante robustos por não apresentarem em geral influências ambientais, sendo qualificados como marcadores neutros (Morgante & Olivieri, 1993; Goldstein & Schlötterer, 1999; Avise, 2004).

Os marcadores microssatélites são caracterizados por unidades de seqüência de repetições de nucleotídeo de 1 a 6 pb, repetidas lado a lado (Tautz, 1989). Esses marcadores estão presentes nos genomas de procariotos e eucariotos (Goldstein & Schlötterer, 1999), tanto em regiões codificadoras quanto em regiões não codificadoras; e usualmente apresentam altos índices de polimorfismo, devido ao alto nível de variação no número de repetições (Li et al., 2002). Além disso, os marcadores microssatélites apresentam herança codominante, o que permite a diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos (Rafalski et al., 1996).

A magnitude das proporções de polimorfismo observadas em marcadores microssatélites tem sido associada à alta incidência de mutação sobre esses locos, cerca de 10^{-4} , quando comparada à proporções estimada de mutação pontual, de aproximadamente 10^{-10} (Hancock, 1999). A proporção de polimorfismo estabelecida por esses marcadores sugerem que possam ser amplamente empregados para estudos de divergência populacional. Contudo, estimativas sobre sua proporção e padrão de mutação são necessárias para uma determinação mais ajustada da distância genética entre populações (Di Rienzo et al., 1994). O modelo “*Stepwise Mutation Model*” (SMM), proposto por Ohta & Kimura (1973), assume que as alterações da estrutura

alélica ocorrem pela adição ou deleção de uma unidade de repetição. Em geral, as mutações incidentes sobre os locos microssatélites são explicadas por “*Stepwise Mutation Model*”, embora tais eventos possam também ser explicados pelo Modelo de Mutação de Infinitos Alelos. O Modelo de Mutação de Alelos Infinitos (IAM) propõe que cada mutação envolve um número variável de unidades de repetição (Kimura, 1964). O modelo “*Two-phase Mutation Model*” (TPM) assume que a maioria das mutações resulta em um acréscimo ou decréscimo de uma unidade de repetição, embora as mutações possam implicar em alterações de mais de uma unidade de repetição. A freqüência de alterações sobre uma unidade de repetição ocorre com probabilidade igual a p e mutações envolvendo mais de uma unidade repetitiva, com probabilidade igual a $1-p$ (Di Rienzo et al., 1994). A percepção do modelo de mutação aplicável é essencial para se estimar certos parâmetros populacionais, sobretudo diferenciação genética e número de migrantes (Goldstein & Schlötterer, 1999).

Os marcadores microssatélites vêm sendo apontados como os mais adequados para estudos populacionais. Isso pode ser evidenciado em um estudo realizado por Chase, Kessely, & Bawa (1996), o qual constatou que apenas quatro locos polimórficos apresentaram mais sensibilidade e resolução do que os efeitos combinados de todos os marcadores isoenzimáticos previamente detectados para *Pithecellobium elegans* (Mimosoideae) em um período de cinco anos. Com isso, estudos utilizando marcadores microssatélites para avaliações do sistema de reprodução, fluxo gênico, estudos de paternidade e estrutura genética populacional em diversas espécies arbóreas tropicais têm sido expressivamente intensificados (Chase et al., 1996; Gaiotto et al., 2003). A relevância desses marcadores em estudos de espécies arbóreas tropicais pode ser evidenciada em trabalhos com *Pithecellobium elegans* (Chase et al., 1996), *Carapa guianensis* (Dayanandan et al., 1999), *Neobalanocarpus heimii* (Konuda et al., 2000),

Caryocar brasiliense (Collevatti et al., 2001b), *Swietenia humilis* (White & Powell, 1997), *Caesalpinia echinata* (Lira et al., 2003), entre outros.

Nesse contexto, Danquah *et al* (2002), ao testarem cinco pares de “primers” microssatélites, constataram altos índices de polimorfismo em três espécies de *Echinochloa* provenientes de três áreas geograficamente distintas. Todos os microssatélites revelaram polimorfismo inter e intra-específico, apresentando de três a sete alelos por loco. A diversidade gênica em quatro marcadores polimórficos para *Echinochloa crus-gali* foi estimada entre 0,12 e 0,61. Segundo os autores, os resultados compilados sugerem que esses marcadores poderiam constituir uma classe bastante aplicável em estudos de diversidade intra-específica. Adicionalmente, Broun *et al* (1992) relataram que apesar de espécies vegetais autofecundantes apresentarem menores índices de variabilidade genética, o que dificulta a distinção entre indivíduos e variedades, o uso de fragmentos de DNA amplificados a partir de regiões específicas, utilizando marcadores minissatélites, pode conferir resultados satisfatórios referentes à obtenção de polimorfismo. No mesmo contexto, Ramakrishnan *et al* (2002) concluíram que, muito embora o sistema reprodutivo de *Bromus tectorum* seja restrito à autofecundação obrigatória, sua variabilidade genética pode ser claramente evidenciada por meio de marcadores microssatélites.

1.2 Genética e conservação de populações naturais

Os estudos realizados com o propósito de se mensurar a variação genética de populações têm se prestado cada vez mais a fundamentações teóricas no domínio da Biologia da Conservação (Chase et al., 1996; White & Powell, 1997; Dayanandan et al., 1999; Konuda et al., 2000; Collevatti et al., 2001b; Lira et al., 2003; Andrianoelina et al., 2006; Alves et al., 2007; Azevedo et al., 2007; Besnard et al., 2007; Isagi et al.,

2007; Karasawa et al., 2007; Marquardt et al., 2007; Raposo et al., 2007; Setsuko et al., 2007; Williams et al., 2007; Fady et al., 2008; Hanson et al., 2008; Pakkad et al., 2008; Tamaki et al., 2008). Para isso, os principais fatores biológicos e genéticos envolvidos na constituição da diversidade e diferenciação genética têm sido constantemente considerados. Dentre estes, destacam-se o tamanho populacional, o fluxo gênico, o sistema reprodutivo e a seleção natural (Lowe et al., 2004).

A aplicação da genética molecular para fins conservacionistas têm sido propostos a partir do reconhecimento de níveis intensos de depleção de espécies naturais, como consequência do desenvolvimento irrestrito da população humana (O'Brien, 1994). Os trabalhos genéticos conduzidos sob a óptica da biologia da conservação em geral contemplam aspectos sobre depressão endogâmica, perda de variação genética de pequenas populações, adaptação genética a cativeiros e efeitos de reintrodução, depressão exogâmica, fragmentação de populações e redução em migração e incertezas taxonômicas e introgressão (Frankham, 1995). A compreensão desses parâmetros, bem como suas implicações e significados para a manutenção das interações ecológicas e evolutivas, têm sido fundamentais tanto para considerações a respeito de conservações “*in situ*” e “*ex situ*” quanto para o uso de recursos genéticos florestais. (Young et al., 2000).

Endogamia é compreendida como um sistema de acasalamento no qual os indivíduos parentais apresentam um grau de parentesco entre si maior do que a média da população, ou seja, estão relacionados por ascendência. Em populações pequenas, o aumento da freqüência de cruzamentos entre indivíduos geneticamente semelhantes pode conduzir ao rápido declínio da variabilidade genética devido à redução da proporção de heterozigotos e ao aumento na incidência de alelos deletérios na população. O decréscimo da variabilidade genética devido ao aumento de cruzamentos entre indivíduos aparentados é denominado depressão endogâmica (Soulé & Wilcox,

1980b). De forma análoga, a variabilidade genética pode ser reduzida por meio de deriva gênica. A deriva gênica é entendida como a alteração aleatória da freqüência alélica da população, sendo alguns alelos fixados e outros perdidos (Wright, 1931; 1951; Franklin, 1980; Frankham, 1995). Em populações pequenas a freqüência gênica muda de geração a geração, mesmo na ausência de seleção, mutação ou migração. Tais mudanças conduzem naturalmente a um aumento gradual na proporção de homozigose da população. Em última instância, o aumento de homozigotos na população proporciona a fixação de determinados alelos, sendo assim perdida a variabilidade genética (Franklin, 1980).

O fluxo gênico é a proporção de migração de genes em uma população. O termo se aplica tanto para introdução de novos genes por imigração quanto para a emigração de genes para outras populações. Para organismos estacionários, o fluxo gênico se constitui pelo movimento de gametas (pólen) e zigotos (sementes). Conforme o padrão do fluxo gênico, a estrutura populacional pode sofrer extensos impactos (Lowe et al., 2004). O fluxo gênico apresenta um efeito homogeneizador da composição genética entre populações (Slatkin, 1985; 1987; Futuyma, 1992). Os principais modelos de fluxo gênico são:

- (1) Modelo de “*continente-ilha*” que considera a orientação de fluxo unidirecional, de uma fonte grande (continental) para uma pequena isolada (MacArthur & Wilson, 1967);
- (2) Modelo de “*ilhas*”, o qual considera que as subpopulações apresentam o mesmo tamanho e fluxo gênico, independentemente da proximidade ou direção (Wright, 1942).
- (3) Modelo “*Stepping-stone*”, considera a dimensão espacial para a ocorrência do fluxo gênico, ou seja, o fluxo somente ocorre entre populações adjacentes (Kimura, 1953).

(4) Modelo de isolamento por distância, a distribuição dos indivíduos é espacialmente contínua, entretanto o fluxo gênico é restrito a curtas distâncias, o que estabelece a formação de “vizinhanças genéticas” (Wright, 1942; 1951).

Os fatores que determinam as propriedades do fluxo gênico podem ser intrínsecos (sistema reprodutivo, vagilidade e dispersão) e extrínsecos (barreiras físicas e gradientes de seleção) (Wright, 1942). Em situações cujo fluxo gênico é extenso, espera-se a observação de uma baixa proporção de endogamia dentro das populações e baixa divergência genética entre populações. Já em circunstâncias nas quais o fluxo gênico é limitado, mas a troca gênica entre indivíduos adjacentes é intensa, espera-se a observação de uma alta proporção de endogamia dentro da população e divergência entre populações (Coles & Fowler, 1976).

Desflorestamento contínuo, fragmentação florestal e aumento de poluição, além de outras alterações na paisagem, podem afetar os processos demográficos e genéticos de uma população, influenciando sua composição genética e, em última instância, levando-a a extinção (Young et al., 2000). Dessa forma, a ocorrência de distúrbios naturais freqüentemente aumenta a probabilidade de extinção em espécies (Foster, 1980). Os principais fatores que conduzem à extinção são a perda de habitat, a introdução de espécies, a superexploração e a poluição. Esses fatores muitas vezes ocasionam reduções no tamanho populacional, cuja consequência é o aumento da suscetibilidade a efeitos estocásticos, climáticos, demográficos ou genéticos (Frankham, 1995). Em geral, a redução no tamanho de uma determinada população aumenta a probabilidade de extinção devido à eliminação de pequenas populações (Foster, 1980) ou por proporcionar desarranjos em sua distribuição espacial, ocasionando o estabelecimento de populações pequenas, fragmentadas e isoladas. Esses eventos poderiam conduzir a um processo denominado vórtice de extinção, cujas consequências levariam à extinção local da população (Soulé & Gilpin, 1986).

A fragmentação florestal tem exprimido relevantes modificações ao fluxo gênico e o desmatamento e corte seletivo têm promovido a redução da densidade de espécies arbóreas (Dayanandan et al., 1999; Young & Boyle, 2000). Em termos gerais, tais eventos têm proporcionado continuamente graves consequências aos processos genéticos concernentes a tais populações, pois estabelecem a longo prazo alterações em seus padrões reprodutivos e aumento de seus índices de endogamia (Dayanandan et al., 1999). Para Young & Boyle (1999), além do aumento dos níveis de endogamia, a fragmentação florestal vem exercendo continuamente a perda da diversidade genética em populações e espécies, bem como promovendo mudanças na estrutura interpopulacional.

O processo de fragmentação promove a perda da continuidade da vegetação original, reduz o tamanho do habitat e aumenta o efeito de borda. Com isso, eventos de fragmentação podem proporcionar alterações nos padrões locais e regionais da biodiversidade devido à perda de micro-habitats, insularização do habitat e modificações nos padrões de dispersão e migração das espécies (Soulé & Kolm, 1989). Além disso, o estágio sucessional (Kang & Bawa, 2003) e fragmentação do habitat (Quesada et al., 2004; Lobo et al., 2005) podem afetar significativamente a atividade de polinizadores e a fenologia de espécies arbóreas tropicais.

A redução do tamanho populacional e o aumento da fragmentação do habitat promovem diferenciação genética entre populações em função da ocorrência de eventos como efeito fundador, deriva genética, aumento do índice de endogamia e redução do fluxo gênico interpopulacional (Ellstrand & Elam, 1993; Young et al., 1999). Como consequência, tais eventos têm estabelecido perdas e fixações aleatórias de alelos e aumento no grau de parentesco dentro de populações (De Rochambeau et al., 2000). Segundo Hamrick (1983) a incidência prolongada de eventos endogâmicos proporciona a diminuição dos níveis de diversidade genética, cujos efeitos estabelecem em uma

baixa proporção de recrutamento, que culmina potencialmente em um aumento do risco de extinção da espécie.

Embora diversos estudos tenham buscado estabelecer as consequências de eventos de fragmentação, de corte seletivo e desmatamento sobre a variabilidade genética de populações arbóreas (Bawa, 1973; Ellstrand, 1990; Chase et al., 1996; Hall et al., 1996; Dayanandan et al., 1999; Young et al., 1999; Sebbenn et al., 2000; Seoane et al., 2000; Young & Boyle, 2000; Collevatti et al., 2001a; Quesada et al., 2003; Conte, 2004; Quesada et al., 2004; Fagundes et al., 2007; Franceschinelli et al., 2007; Isagi et al., 2007; Raposo et al., 2007; Hanson et al., 2008; Tamaki et al., 2008), pouco se conhece sobre sua aplicabilidade em sistemas tropicais. Isso se deve em função escassez de conhecimentos sobre a ecologia de espécies nativas e das características dos recursos naturais em biomas tropicais (Mooney et al., 1980). Todavia, sabe-se que o principal efeito esperado de redução e fragmentação de habitat é a redução no tamanho populacional. Como consequência, a redução populacional poderá implicar na perda de conectividade entre populações e deriva gênica, que aumentarão a possibilidade de eventos endogâmicos. A deriva gênica e a endogamia poderão resultar na diminuição dos níveis de diversidade genética, que pode ser detectada por desvios significativos no modelo de Hardy-Weinberg em termos da estimativa de F_{IS} (Frankham, 1995; Reed & Frankham, 2003).

Neste contexto, a concepção prática acerca do processo de fragmentação e suas implicações para a diversidade genética têm aventado que a fragmentação florestal comumente proporciona a reduções expressivas do tamanho populacional, o que resulta na instauração de gargalos genéticos “*bottlenecks*”. Isso é devido aos indivíduos remanescentes conterem apenas parte do “*pool*” gênico original (Franklin, 1980; Ellstrand & Elam, 1993; Young & Boyle, 2000). Além disso, em circunstâncias de continuidade de isolamento populacional subsequente a um evento “*bottleneck*”, a

população provavelmente sofrerá perda de alelos devido à deriva genética, diminuindo a variabilidade dentro de populações e aumentando a diferenciação entre populações (Young & Boyle, 2000). A curto prazo, a perda da variabilidade genética poderia reduzir a capacidade adaptativa da espécie, cujo resultado poderia culminar em sua extinção local (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Enquanto, a longo prazo, limitaria sua capacidade de resposta a alterações ambientais, o que poderia conduzir à incapacidade de responderem a mudanças por ação de forças seletivas (Franklin, 1980; Charlesworth & Charlesworth, 1987).

Outra consequência de eventos de fragmentação florestal é o acréscimo do número de acasalamentos entre indivíduos geneticamente aparentados. O aumento do índice de endogamia pode resultar em um excesso de homozigose, o que possibilita a instituição de depressão endogâmica (Franklin, 1980; Ellstrand & Elam, 1993; Young & Boyle, 2000). Desse modo, os efeitos negativos da endogamia incidem diretamente sobre o valor adaptativo da espécie (Charlesworth & Charlesworth, 1987), que podem ser evidenciados quanto à quantidade de pólen, número de óvulos, quantidade de sementes, proporção de germinação e crescimento e capacidade competitiva (Frankham et al., 2002).

O fluxo gênico estabelece a homogeneização entre populações arbóreas florestais por meio da transferência de pólen e sementes. Com isso, eventos de dispersão podem mitigar ou eliminar efeitos disruptivos de seleção e deriva genética (Ellstrand & Elam, 1993; Hamrick & Nason, 2000). Embora a ocorrência de reduções do tamanho populacional em populações fragmentadas seja bastante comum, a ocorrência de migração entre populações podem contrabalancear efeitos de deriva gênica, endogamia e seleção. Desse modo, um conjunto de pequenas populações podem se comportar como uma grande população de área equivalente. Portanto, proporções adequadas de

migração em pequenas populações podem compensar grandes perdas da variabilidade devido à deriva gênica (Ellstrand & Elam, 1993; Frankham et al., 2002).

Melo Júnior (2003), estudando a variabilidade genética, o fluxo gênico, o tamanho efetivo populacional e a distribuição espacial de *Caryocar brasiliense* com marcadores isoenzimáticos, observou elevados níveis de heterozigosidade esperada e observada, ausência de endogamia dentro e entre populações, baixa divergência entre populações, alto fluxo gênico e distribuição espacial aleatória.

Collevatti *et al.* (2001a), estudando 10 populações de *Caryocar brasiliense*, observaram de 20 a 27 alelos por loco para 10 marcadores microssatélites. Os coeficientes de endogamia (f) das populações estudadas foram significativamente diferentes entre populações de áreas perturbadas e fragmentadas e áreas contínuas e não-perturbadas. Os autores sugerem que o tipo de dispersão de sementes (por gravidade) e a magnitude da fragmentação do Cerrado podem estar limitando o fluxo gênico por dispersores e polinizadores, aumentando a proporção de acasalamento entre indivíduos parentados.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos da estrutura do habitat sobre a diversidade e estrutura genética de *C. brasiliense*, a ocorrência de gargalo genético e o aumento do grau de parentesco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Caryocar brasiliense*

Caryocar brasiliense é uma espécie arbórea típica do cerrado pertencente à família Caryocaraceae (Lorenzi, 1998). A família Caryocaraceae é exclusivamente neotropical e compreende 23 espécies e dois gêneros (*Caryocar* e *Anthodiscus*) (Prance & Silva, 1973). *C. brasiliense*, conhecido popularmente por piqui, pequi, piqui-do-cerrado, almendro, barbasco, jiquiá, pequizeiro ou piquirana, é uma espécie semidecídua, heliófita, seletiva xerófita, marcadamente presente em toda a área do Cerrado brasileiro (Lorenzi, 1998). A espécie se distribui do sul do estado do Pará, ao longo da borda da região amazônica, até o estado do Paraná e o Paraguai (Prance & Silva, 1973).

O pequizeiro apresenta prioritariamente fecundação cruzada, sendo suas flores polinizadas principalmente por duas espécies de morcegos glossofaríngeos (*Glossophaga soricina* e *Annoura geoffroyii*), três não-glossofaríngeos (*Phyllostomus discolor*, *Vampyrops lineatus* e *Carollia perspicillata*) e duas espécies de mariposa (*Erinyis ello* e *Pseudosphinx tetrio*). (Gribel & Hay, 1993). A dispersão das sementes de é notoriamente zoocórica. Dentre os principais agentes dispersores se destacam a ema (*Rhea americana*), espécie de maior potencial dispersivo, cuja dispersão dos diásporos se caracteriza por endozoocoria, seguida da gralha (*Cyanocorax crostatellus*) e da cotia (*Dasyprocta* sp.), as quais podem atuar como dispersoras de sementes por sinzoocoria (Gribel, 1986).

2.2 Área de estudo

O estudo foi realizado em duas localidades no município de Japonvar ($15^{\circ}59' S$ e $44^{\circ}16' W$), norte do estado de Minas Gerais. Ambas as localidades apresentavam elementos típicos de cerrado *sensu stricto*. A distância geográfica entre as áreas é de aproximadamente 5 km. As áreas foram escolhidas por se apresentarem em diferentes estágios de sucessão. As áreas foram classificadas como pastagem (estágio inicial de sucessão) e Cerradão (estágio final de sucessão). Em cada localidade foram marcados aleatoriamente 45 indivíduos (30 indivíduos adultos e 15 indivíduos jovens). Para a análise, os indivíduos foram classificados por classe etária conforme os seguintes parâmetros:

- i) Jovens: Indivíduos com até 2 metros de altura e CAP máximo de 20 cm.
- ii) Adultos: Indivíduos com cerca de 5 metros de altura e CAP mínimo de 50 cm.

2.3 Extração do DNA genômico

O material amostrado foi constituído de folhas em estágio intermediário de desenvolvimento. As amostras foliares foram acondicionadas em gelo durante o período de coleta. Após a coleta, o material foi estocado em freezer a $-20^{\circ}C$ até o momento da extração do DNA.

A extração do DNA genômico foi desenvolvida utilizando protocolo baseado em Doyle & Doyle (1990). O material foi macerado em tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4M, PVP 1% (p/v), β -mercaptoetanol 0,2% (v/v), EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM e proteinase K 0,05ng/ μ l) com o auxílio de um agitador FastPrep, marca Bio 101 Savant.

2.4 Amplificação dos locos

A amplificação do material foi realizada utilizando dez pares de iniciadores microssatélites previamente desenvolvidos para *C. brasiliense* (Collevatti *et al*, 1999). Os marcadores “forward” foram previamente marcados com fluorescências HEX (verde), NED (amarelo) e 6-FAM (azul) (Tabela 1).

Tabela 1 - Informações sobre os locos microssatélites de *Caryocar brasiliense*, com as respectivas amplitudes alélicas, temperaturas de hibridização (T_a) e número total de alelos por loco esperado (\hat{A}) (Collevatti et al., 1999).

Locos	Seqüência do iniciador (5’-3’)	Amplitude alélica (pb)	T_a (°C)	\hat{A}
cb1	F: [NED] GGTGTGAGCTTAGAGCTGAA	189	54°C	18
	R: GTCCAGCTTAATGTCCGACT	150-195		
cb3	F: [HEX] CAGCCATGGTTCACGTTAGT	158	56°C	19
	R: CGCACATGGAAACGCTTA	130-175		
cb5	F: [6-FAM] GTCAGAACATGAAGGCAGCTTG	153	56°C	16
	R: ATAGAACATCCAGGCCACACCA	130-180		
cb6	F: [NED] CTACCACAACTCGGAGACAA	123	56°C	14
	R: GACACTCCTGCAACTCCATT	105-160		
cb9	F: [NED] ATCGAGATGAGCCAACCGAC	92	56°C	13
	R: GGAAGGTGTTGCAGCACTGA	55-95		
cb11	F: [HEX] GGTCGTTATTGCTGTGGT	176	56°C	15
	R: GTGAACATGAGCATCGGT	135-185		
cb12	F: [NED] GACATGTGGCAATAGGCGGT	179	56°C	20
	R: TTGTGTGTGAAGGTGTGGTT	150-210		
cb13	F: [HEX] AGCAGTTAGATGATGAAGTG	145	54°C	15
	R: CTATTGCCATATGTCGTAGT	125-170		
cb20	F: [6-FAM] TGACACAAACCATCACATTCT	164	56°C	17
	R: GCAACTGTCGCAATAAACAA	140-185		
cb23	F: [6-FAM] ATACCAGCTCTGACAGAA	153	56°C	23
	R: AAGCCTGAGAGTAGAGAA	110-185		

O DNA dos indivíduos foi amplificado por reações em cadeia de polimerase (PCR), sendo desenvolvidas com um volume final de 10 μ l contendo 9,0 ng de DNA genômico, 1X tampão I B (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 15 mM

MgCl₂, pH 8,4), 0,25 mg de BSA, 250 µM de cada dNTP, 0,8 µM de cada “*primer*” e 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Photoneutria).

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador marca Applied Biosystems, modelo GeneAmp PCR System 9700. A programação estabelecida para a amplificação do DNA consistiu de uma desnaturação prévia de 2 minutos a 94°C; seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C ou 56°C, conforme temperatura específica dos “*primers*” (Tabela 1), e 1 minuto a 72°C; o programa foi finalizado por uma etapa de alongamento de 30 minutos a 72°C.

2.5 Genotipagem

A genotipagem foi efetuada em seqüenciador automático de DNA marca Applied Biosystems, modelo ABI Prism 377 DNA Sequencer. O material amplificado foi reunido a um padrão interno ROX de 500 pb (Applied Biosystems) e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 2%. Os eletroferogramas foram analisados utilizando o software GeneScan, versão 2.5 (Applied Biosystems). Os genótipos foram obtidos utilizando o software Genotyper, versão 2.5 (Applied Biosystems).

2.6 Análises estatísticas

2.6.1 Avaliação de erros de genotipagem

Os eventuais erros de genotipagem (alelos nulos, “Stuttering” e “Dropout”) foram avaliados utilizando o programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004), baseada em 1.000 randomizações, com intervalo de confiança de 95%. Além disso, utilizou-se a comparativamente a correção de Bonferroni (Goudet et al., 1996).

2.6.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação

As freqüências genotípicas por loco foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o programa GenePop 4.0 (Raymond & Rousset, 1995). A significância estatística foi estimada por teste exato, utilizando os métodos de enumeração e cadeia de Markov e avaliados por χ^2 através do Método de Fisher. Além disso, os locos foram testados quanto ao equilíbrio de ligação utilizando o programa *FSTATS* 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

2.6.3 Diversidade e estrutura genética

A diversidade genética foi estimada por estimativas de heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e heterozigosidade esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e), número médio de alelos por loco (\hat{A}) e coeficiente de fixação de Wright (f).

A estrutura genética foi estimada a partir dos coeficientes de coancestralidade de Cockerham (1969). Os coeficientes foram estimados a partir da variância das freqüências alélicas dos indivíduos, sendo $F=F_{IT}$ (coeficiente de endogamia total), $f=F_{IS}$ (coeficiente de endogamia), $\Theta=F_{ST}$ (coeficiente de coancestralidade), utilizando o programa *FSTATS* 2.9.3.2 (Goudet, 2002), baseado em 1.000 randomizações, com o nível de significância de $p \leq 0,05$ corrigidas pelo teste de Bonferroni (Goudet et al., 1996).

A estruturação populacional foi ainda avaliada utilizando o software Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000). O número de “clusters” (K) da base de dados foi inferido a partir de uma aproximação bayesiana sem informação prévia. A estimativa foi desenvolvida assumindo um modelo “*admixture*”, com $\lambda=1$ a 10, $k=1$ a 4 e 1000 interações e 1000 repetições para o período “*burn-in*”.

2.6.4 Gargalo populacional

A análise de gargalo populacional foi realizada utilizando o programa Bottleneck versão 1.2.02 (Piry et al., 1999). O teste foi desenvolvido a partir da comparação entre heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade esperada para locos em equilíbrio de mutação e deriva (H_{eq}), sob o modelo de mutação “*Stepwise Mutation Model*” – SMM. A interpretação do número de locos com excesso de heterozigosidade pelo teste de Wilcoxon (Luikart et al., 1997).

2.6.5 Parentesco

Os coeficientes de coancestria (θ_{xy}) entre pares de indivíduos por classe e/ou área foram estimados a partir dos coeficientes de parentesco (r_{xy}) entre os pares de indivíduos, conforme estabelecido por Queller e Goodnight (1989). Os coeficientes de parentesco (r_{xy}) foram estimados utilizando o programa Mark 2.0 (Ritland, 2004). Simulação de Monte Carlo foi conduzida para estimar as variâncias e os erros-padrão dos coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos. Os parentescos dos indivíduos por classes e áreas foram avaliados por análise de variância (ANOVA), com modelos lineares generalizados e distribuição de erros Quasipoisson (Crawley, 2002), seguidos pelo teste de F, utilizando o programa R 2.6.2 (R Development Core Team, 2008).

3 RESULTADOS

Os dez locos microssatélites utilizados apresentaram produtos de amplificação conforme esperado, sendo perfeitamente empregáveis para genotipagem de *Caryocar brasiliense* (Figura 1).

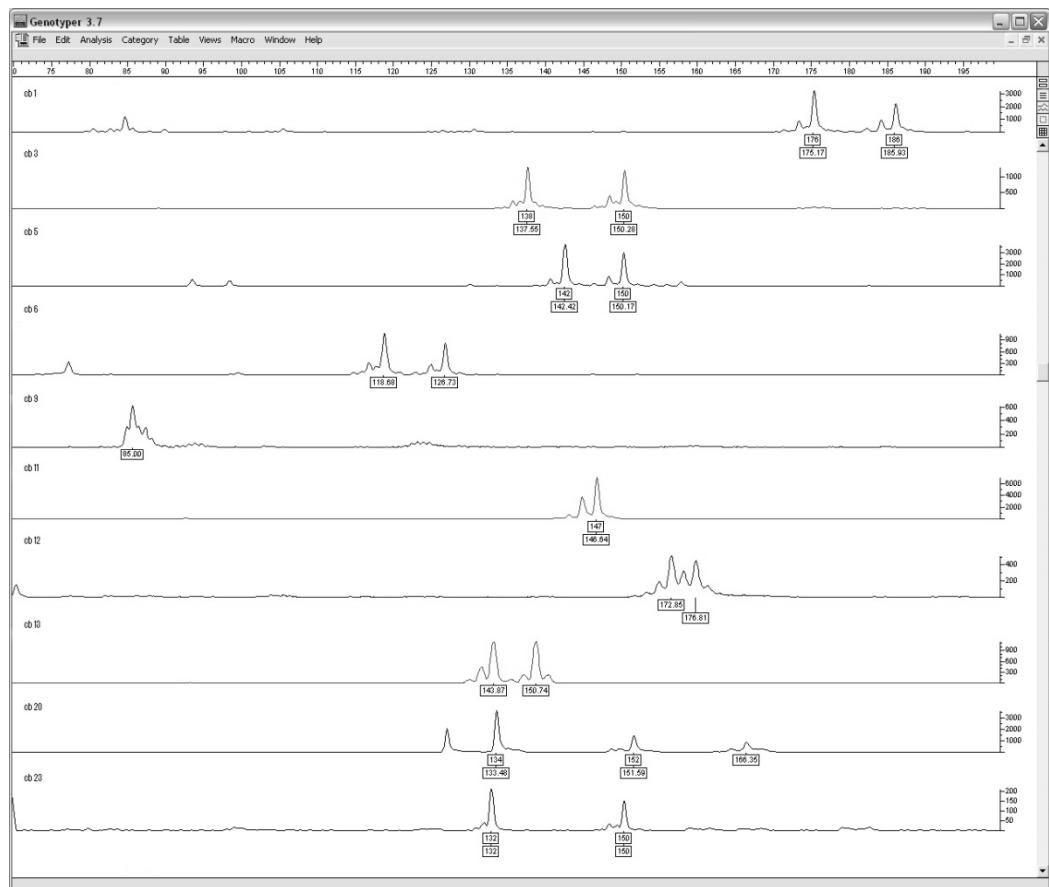


Figura 1 – Perfil dos eletroferogramas para 10 locos de *Caryocar brasiliense*.

3.1.1 Avaliação de erros de genotipagem

A análise dos erros de genotipagem revelou que locos cb 9, cb 13 e cb 23 apresentaram evidências de presença de alelos nulos devido a constatação de desvios significativos em função das freqüências de homozigotos (Figura 2) e de diferenças de tamanho de alelos (Figura 3) esperados e observados.

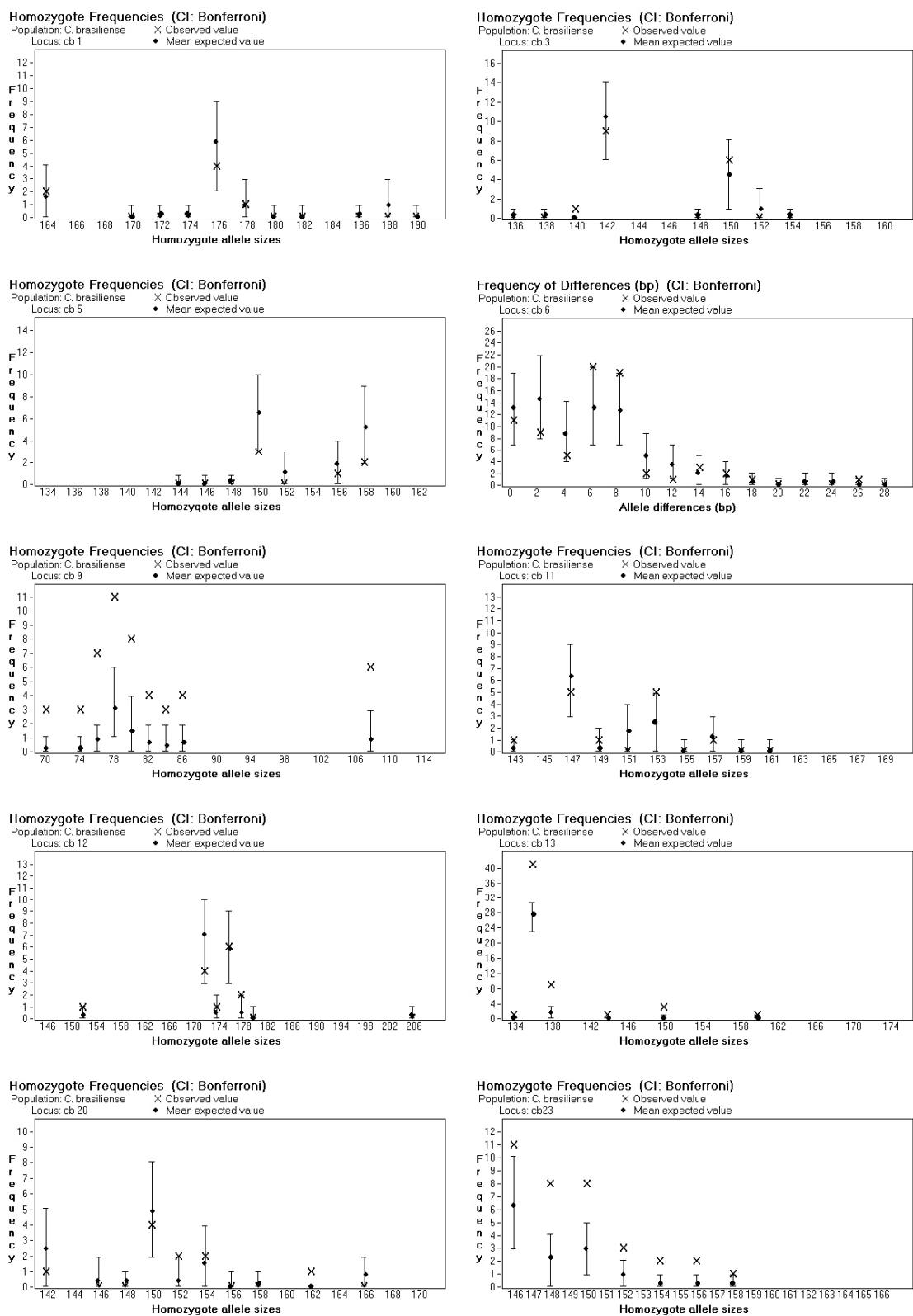


Figura 2 – Freqüência de homozigotos esperados e observados para 10 locos microssatélites em *Caryocar brasiliense*.

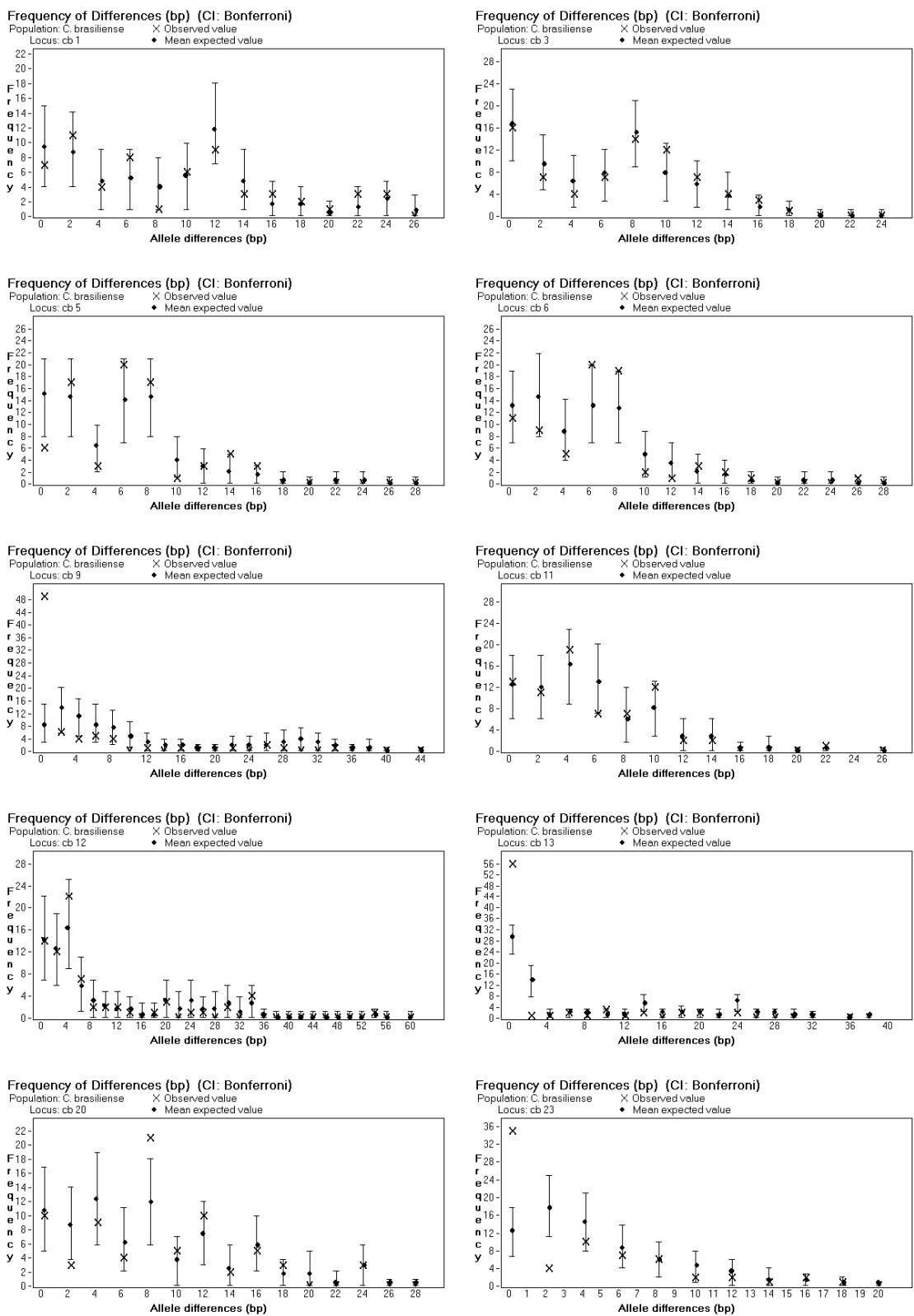


Figura 3 – Freqüência de diferenças do tamanho alélico (pb) esperados e observados para 10 locos microssatélites em *Caryocar brasiliense*.

Após a análise dos possíveis erros de genotipagem inerentes aos 10 locos microssatélites, os mesmos foram previamente caracterizados. A caracterização revelou que o número de alelos por loco variou de 11 (cb 5 e cb 23) a 18 (cb 9 e cb 12), com média de 13,5 alelos por loco. A heterozigosidade média esperada (H_e) variou entre 0,599 e 0,894 e a heterozigosidade média observada (H_o), entre 0,247 e 0,92 (Tabela 2). Exceto pelos locos cb 9 e cb 13, todos os locos apresentaram valores elevados de heterozigosidade, o que característico de marcadores microssatélites devido a um grande número de alelos por loco.

Tabela 2 – Caracterização genética dos 10 locos microssatélites de *Caryocar brasiliense* (N: número de indivíduos amostrados; A: número total de alelos por loco; H_{ot} : número total de alelos homozigotos observados; H_{et} : número total de alelos homozigotos esperados; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg; f : coeficiente de endocruzamento.

Loco	N	A	H_{ot}	H_{et}	H_o	H_e	f
cb 1	61	13	7	9,868	0,885246	0,845143	-0,047865 ^{ns}
cb 3	75	12	16	16,820	0,786667	0,780940	-0,007383 ^{ns}
cb 5	75	11	6	15,039	0,920000	0,804832	-0,144202 ^{ns}
cb 6	75	12	11	13,148	0,840000	0,829172	-0,013148 ^{ns}
cb 9	75	18	49	8,533	0,360000	0,894318	0,599077*
cb 11	74	12	13	12,513	0,824324	0,836551	0,014714 ^{ns}
cb 12	75	18	14	14,593	0,813333	0,810828	-0,003111 ^{ns}
cb 13	73	15	56	29,013	0,246575	0,598961	0,590003*
cb 20	75	13	10	10,866	0,866667	0,860850	-0,006803 ^{ns}
cb 23	70	11	35	12,821	0,500000	0,822713	0,393977*
Média	13,5	21,7	14,321	0,704281	0,808431	0,129625 ^{ns}	

* significativo para $p < 0,05$; ^{ns} Não-significativo.

Todos os locos microssatélites foram ainda testados para verificação da aderência de suas freqüências genotípicas ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 – Teste para o desequilíbrio de ligação de 10 locos de *C. brasiliense*.

Loco	cb 1	cb 3	cb 5	cb 6	cb 9	cb 11	cb 12	cb 13	cb 20	cb 23
cb 1	-									
cb 3	0,071	-								
cb 5	0,619	0,046	-							
cb 6	0,931	0,524	0,001*	-						
cb 9	0,92	0,517	0,131	0,027	-					
cb 11	0,952	0,508	0,593	0,206	0,03	-				
cb 12	0,598	0,287	0,167	0,344	0,977	0,296	-			
cb 13	0,063	0,093	0,021	0,194	0,582	0,756	0,524	-		
cb 20	0,798	0,778	0,092	0,047	0,501	0,848	0,327	0,348	-	
cb 23	0,211	0,037	0,317	0,049	0,201	0,337	0,378	0,231	0,934	-

* significativo para $p \leq 0,001$, valor nominal ajustado.

Tabela 4 – Teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg de 10 locos de *C. brasiliense*.

Loco	p-value			
	Jovem/Pastagem	Jovem/Cerrado	Adulto/Pastagem	Adulto/Cerrado
cb 1	0,3705	0,3137	0,5935	0,5733
cb 3	0,0134	0,7748	0,0213	0,3285
cb 5	0,0962	0,7209	0,1300	0,1485
cb 6	0,0042	0,4034	0,0075	0,0767
cb 9	0,0000*	0,0033*	0,0000*	0,0000*
cb 11	0,8761	0,4045	0,4680	0,0013
cb 12	0,7357	0,6378	0,3939	0,3732
cb 13	0,0040*	0,0012*	0,0000*	0,0000*
cb 20	0,1807	0,4563	0,0617	0,1944
cb 23	0,0000*	0,0006*	0,0000*	0,1347

* Altamente significativo, segundo método de Fisher.

A partir da avaliação da probabilidade de erros de genotipagem e os desvios do equilíbrio Hardy-Weinberg para os 10 locos microssatélites, as informações referentes aos locos cb 9 e cb13 foram subtraídas dos demais dados, sendo utilizando os oito locos remanescentes.

3.1.2 Diversidade e estrutura genética

O número médio de alelos por loco polimórfico variou entre 11 (locos cb 5 e cb 23) e 18 (loco cb 12), sendo observados em média 12,75 alelos por loco. Os índices de heterozigose esperada (H_e) e observada (H_o) variaram de 0,78 a 0,86 e 0,5 a 0,92, respectivamente. Os índices médios de heterozigose esperada (H_e) e observada (H_o) foram 0,824 e 0,804, respectivamente. Além disso, o maior índice de diversidade gênica foi observado para o loco cb 20 (0,861) e o loco cb 3 apresentou a menor diversidade gênica (0,781) (Tabela 2).

A população de *C. brasiliense* da área pastagem apresentou índice de heterozigose e máxima diversidade ligeiramente menores que a população da área de cerrado (Tabela 5). Por conseguinte, os índices de heterozigose esperada e de fixação, bem como a proporção de diversidade máxima da população de pequizeiros do cerrado apresentaram valores mais altos que a população da área de pastagem.

Tabela 5 – Estimativas de parâmetros genéticos para duas populações de *C. brasiliense*, N: número de indivíduos amostrados; A: número médio de alelos por loco; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg; f : índice de fixação.

População	N	A	H_o	H_e	f
Pastagem	36,4	11,4	0,688204	0,810650	0,15289
Cerrado	36,4	11,5	0,721312	0,793111	0,091733
Total	36,4	11,45	0,704758	0,801880	0,122659

As estimativas de estrutura genética para *C. brasiliense*, calculadas a partir dos coeficientes de coancestralidade de Cockerham (1969), não apresentaram valores significantemente diferente de zero (Tabela 6).

Tabela 6 – Estimativa por bootstrapping para oito locos microssatélites de *C. brasiliense*.

Intervalo de Confiança 95%		
F	Θ	f
-0,055	-0,004	-0,058
0,141	0,011	0,141

Os resultados das estimativas de estrutura genética para *C. brasiliense* tanto para classe etária quanto para área, baseada no índice de fixação, coeficiente de coancestralidade, coeficiente de endogamia total e tamanho alélico, não apresentaram valores diferentes de zero, constituindo uma única população (Tabelas 6 e 7).

Tabela 7 – Estrutura genética de *C. brasiliense* baseada na análise da variância das freqüências alélicas e no tamanho dos alelos (R_{ST}) de oito locos microssatélites.

Loco	F	Θ	f	R_{ST}
cb 1	-0,050	-0,008	-0,042	0,026
cb 3	-0,007	0,000	-0,007	-0,018
cb 5	-0,145	-0,002	-0,142	-0,001
cb 6	-0,010	-0,001	-0,008	-0,003
cb 11	0,015	0,000	0,015	-0,007
cb 12	0,003	0,022	-0,019	-0,011
cb 20	-0,001	0,019	-0,021	0,007
cb 23	0,393	-0,009	0,398	0,023
Total	0,025^{ns}	0,003^{ns}	0,022^{ns}	0,0019^{ns}

Coeficiente de endogamia – f (significativo para $p<0,00156$, valor nominal ajustado); Índice de fixação – Θ (significativo para $p<0,008333$, valor nominal ajustado); Coeficiente de endogamia total – F; Diferenciação genética baseada no tamanho dos alelos – R_{ST} ; ^{ns} Não-significativo.

Apesar das estimativas de estrutura genética para *C. brasiliense* não tenham apresentado valores estatisticamente diferentes de zero, a partir da análise das populações utilizando o software Fstats 2.9.3.2, utilizando o software Structure 4.0, duas hipóteses puderam ser bem explicadas: de panmixia e de dois grupos estruturados. No entanto, a hipótese da presença de dois grupos estruturados apresentou o valor

médio do parâmetro α de 2,4643, o que sugere uma grande mistura entre as duas populações (Tabela 8; Figura 4).

Tabela 8 – Estrutura genética de *C. brasiliense* baseado em oito locos microssatélites.

K	Ln P(D)	Var[LnP(D)]	α	Fst_1	Fst_2	Fst_3	Fst_4
1	-2381.9	43.3	-	0.0018	-	-	-
2	-2376.6	98.5	2.4643	0.0008	0.1997	-	-
3	-2464.2	382.3	0.2563	0.0014	0.0354	0.1309	-
4	-2521.6	566.1	0.1538	0.0166	0.0932	0.1477	0.0015

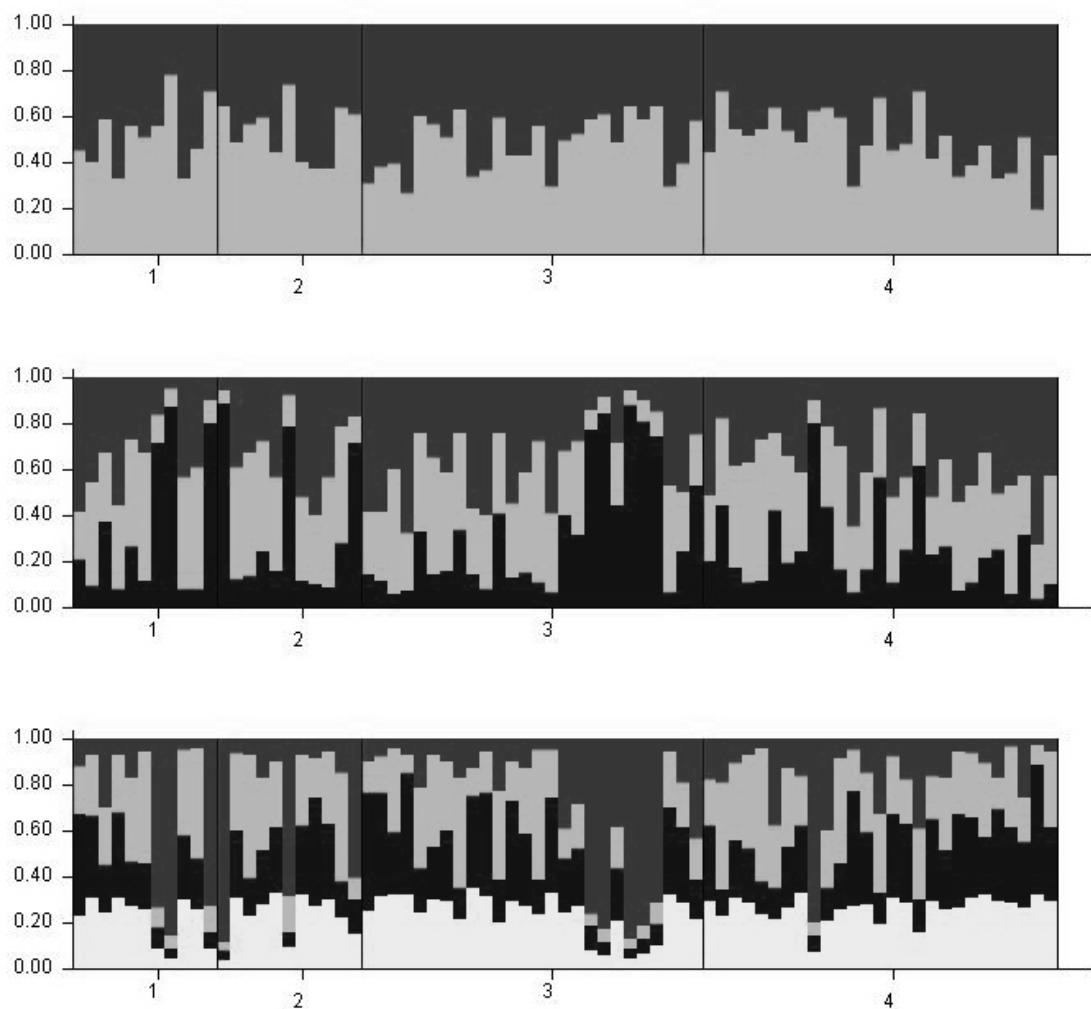


Figura 4 – Estimativa de estrutura genética de *C. brasiliense* baseado em oito locos microssatélites, assumindo K de 2 a 4 populações. As populações foram subdivididas da seguinte forma: 1=Jovens/Pastagem, 2=Jovens/Cerrado, 3=Adulto/Pastagem e 4=Adulto/Cerrado

3.1.3 Gargalo Populacional

A avaliação quanto à presença de gargalo populacional por reduções populacionais drásticas evidenciou valores estatisticamente significativos para indivíduos jovens da área de pastagem (Tabela 9). Esse resultado sugere a ocorrência de perturbações dissimilares entre áreas, o que deve ser consequência das diferentes estruturas de habitat atualmente estabelecidas.

Tabela 9 – Estimativas de gargalo populacional em *C. brasiliense*, conforme o modelo “*Stepwise Mutation Model*” – SMM. H_e : heterozigosidade esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg; H_{eq} : heterozigosidade esperada em equilíbrio de mutação e deriva.

Loco	Jovem			Cerrado		
	Pastagem			Cerrado		
	H_e	H_{eq}	p	H_e	H_{eq}	p
cb 1	0,653	0,542	0,169	0,637	0,532	0,215
cb 3	0,697	0,652	0,388	0,606	0,654	0,238
cb 5	0,567	0,523	0,459	0,602	0,529	0,339
cb 9	0,455	0,299	0,284	0,091	0,308	0,204
cb 11	0,628	0,529	0,245	0,645	0,533	0,185
cb 12	0,567	0,528	0,487	0,654	0,526	0,144
cb 20	0,606	0,650	0,252	0,636	0,654	0,356
cb 23	0,654	0,528	0,156	0,602	0,521	0,297
<i>p</i> (one tail H excess)*			0,00977	<i>p</i> (one tail H excess)*		
				0,19141		
Adulto						
Loco	Pastagem			Cerrado		
	H_e	H_{eq}	p	H_e	H_{eq}	p
	cb 1	0,648	0,618	0,450	0,637	0,624
cb 3	0,606	0,608	0,415	0,646	0,604	0,435
cb 5	0,624	0,609	0,463	0,628	0,604	0,490
cb 9	0,399	0,484	0,230	0,230	0,264	0,479
cb 11	0,630	0,481	0,103	0,610	0,485	0,175
cb 12	0,615	0,604	0,451	0,632	0,475	0,090
cb 20	0,624	0,604	0,495	0,561	0,610	0,255
cb 23	0,633	0,483	0,096	0,619	0,479	0,142
<i>p</i> (one tail H excess)*			0,03711	<i>p</i> (one tail H excess)*		
				0,03711		

* Teste de Wilcoxon, todos os locos.

Embora o teste de Wilcoxon tenha estimado valores de $p < 0,05$ para os indivíduos adultos de ambas as áreas (Tabela 9), quando agrupados evidenciaram $p > 0,05$ (Tabela 10). O motivo de se desenvolver o teste para verificação de gargalo populacional para indivíduos adultos agrupando as áreas se deve pela história de ocupação do cerrado, que ocorreu há cerca de 70 anos. Por dedução da idade dos indivíduos adultos, acredita-se que os indivíduos tenham se estabelecido nas áreas quando ambas apresentavam estruturas de habitat semelhantes.

Tabela 10 – Estimativas de gargalo populacional em *C. brasiliense*, conforme o modelo “*Stepwise Mutation Model*” – SMM. H_e : heterozigosidade esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg; H_{eq} : heterozigosidade esperada em equilíbrio de mutação e deriva.

Loco	Jovem			Adulto		
	H_e	H_{eq}	p	H_e	H_{eq}	p
cb 1	0,629	0,490	0,129	0,641	0,584	0,3670
cb 3	0,656	0,613	0,401	0,622	0,589	0,4620
cb 5	0,572	0,490	0,294	0,620	0,583	0,4420
cb 9	0,304	0,262	0,439	0,316	0,458	0,1590
cb 11	0,623	0,487	0,128	0,616	0,453	0,0940
cb 12	0,623	0,481	0,134	0,633	0,581	0,3800
cb 20	0,610	0,694	0,127	0,593	0,672	0,1370
cb 23	0,630	0,488	0,124	0,621	0,463	0,0910
p (one tail H excess)*			0,03711	p (one tail H excess)*		

* Teste de Wilcoxon, todos os locos.

3.1.4 Parentesco

Os coeficientes de coancestria (Θ_{xy}) entre pares de indivíduos indicaram que 16,96% dos indivíduos apresentaram grau de parentesco entre 0,050 e 0,125 (primos). Além disso, observou-se também que 4,75% apresentaram coeficientes de coancestria entre 0,125 e 0,250, (meio-irmãos) e 0,23% apresentaram valores superiores a 0,250 (irmãos). Finalmente, deve-se salientar que 78,05% dos pares de pequizeiros não apresentaram qualquer grau de parentesco (Figura 5).

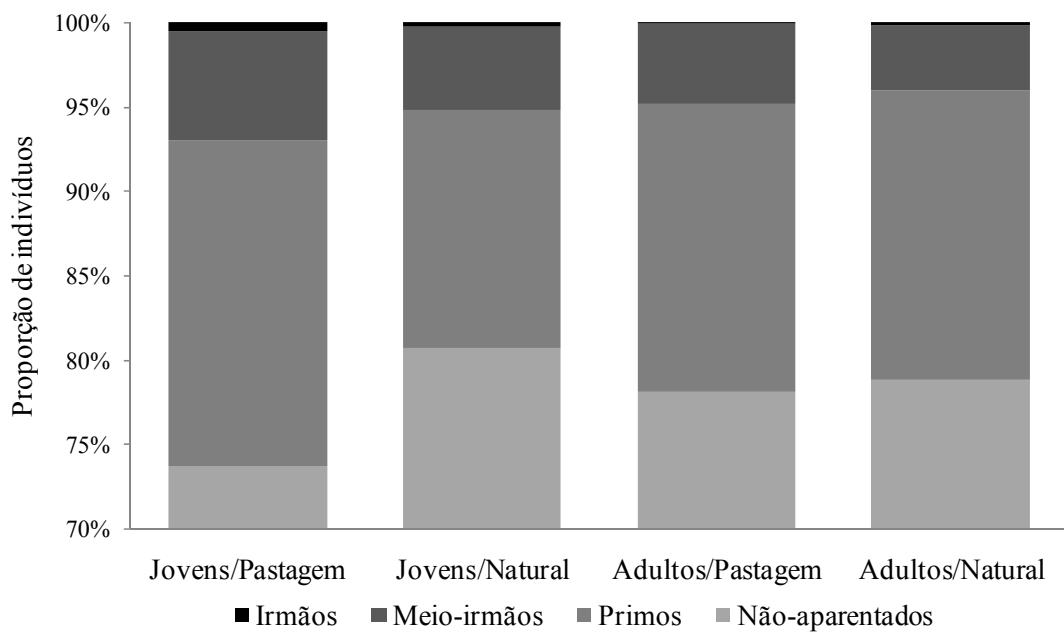


Figura 5 – Distribuição das estimativas de parentesco (r_{xy}) entre pares de indivíduos de *C. brasiliense*, estimados a partir do coeficiente de Queller & Goodnight (1989).

Os coeficientes de coancestria (Θ_{xy}) entre pares de indivíduos por habitat, indicaram que 17,77% dos pequizeiros da pastagem apresentaram grau de parentesco entre 0,050 e 0,125 (primos), 5,30% entre 0,125 e 0,250 (meio irmãos), 0,25% superior a 0,250 (irmãos) e 76,68% não apresentaram qualquer grau de parentesco. No cerrado, os resultados indicaram que cerca de 16,18% dos pequizeiros apresentaram grau de parentesco entre 0,050 e 0,125, 4,22% entre 0,125 e 0,250, 0,21% superiores a 0,250 e 76,95% não apresentaram qualquer grau de parentesco. Os coeficientes de coancestria (Θ_{xy}) por classe etária apontaram que 17,07% dos indivíduos jovens apresentaram grau de parentesco entre 0,050 e 0,125, 4,31% entre 0,125 e 0,250, 0,15% acima de 0,250 e 78,47% não apresentaram qualquer grau de parentesco. Entre adultos, os resultados apontaram que cerca de 16,74% dos indivíduos apresentam grau de parentesco entre 0,050 e 0,125, 5,69% entre 0,125 e 0,250, 0,39% superiores a 0,250 e 77,17% não apresentaram qualquer grau de parentesco (Tabela 11).

Tabela 11 – Proporção de indivíduos aparentados de *C brasiliense* por classe e área estimados a partir do coeficiente de Queller & Goodnight (1989).

Parentesco	Classe etária		Habitat	
	Jovem	Adulto	Cerrado	Pastagem
Não-aparentados	78,47%	77,17%	79,40%	76,68%
Primos	17,07%	16,74%	16,18%	17,77%
Meio-irmãos	4,31%	5,69%	4,22%	5,30%
Irmãos	0,15%	0,39%	0,21%	0,25%

Considerando-se a interação área x classe etária pôde-se observar que um maior percentual de indivíduos geneticamente aparentados está presente entre jovens da área de pastagem (6,46% meio irmãos e 0,53% irmãos). Por outro lado, o maior percentual de indivíduos não-aparentados foi observado entre jovens da área de cerrado (80,65%). Do mesmo modo, pequizeiros adultos das áreas de pastagem e cerrado apresentaram também uma alta incidência de indivíduos não-aparentados (78,11% e 78,81%, respectivamente) (Figura 5).

A estimativa de parentesco (r_{xy}) não variou entre áreas ou classes etária. Contudo, a interação observada entre classe x área indica que o parentesco variou entre classes em pelo menos uma área (Tabela 12). De fato, a estimativa de parentesco variou apenas entre os indivíduos adultos da área de cerrado e jovens da pastagem (Figura 6).

Tabela 12 – Estimativa de valores-p para o grau de parentesco (r_{xy}) entre pares de indivíduos de *C brasiliense* por classes e áreas estimados a partir do coeficiente de Queller & Goodnight (1989).

Classe/Área	F	SE	p
CLASSEJovem	1,2629	0,003594	0,261150
ÁREAPastagem	0,5153	0,002890	0,472898
CLASSEJovem:ÁREAPastagem	7,0493	0,005107	0,007956*

* Significativo, $p < 0,05$.

As estimativas de parentesco médio (r_{xy}) entre pares de indivíduos evidenciaram que os indivíduos jovens da área de pastagem apresentam valores significativamente

mais elevados que as demais condições, sendo o grau de parentesco estimado em $0,03190 \pm 0,00194$. O parentesco médio para indivíduos jovens da área de cerrado foi estimado $0,02518 \pm 0,00165$. O parentesco médio dos indivíduos adultos de ambas as áreas apresentaram valores intermediários, sem apresentar variação estatisticamente significativa. Os parentescos médios dos indivíduos adultos foram estimados em $0,02727 \pm 0,00117$ para pastagem e $0,02596 \pm 0,00117$ para cerrado (Figura 6).

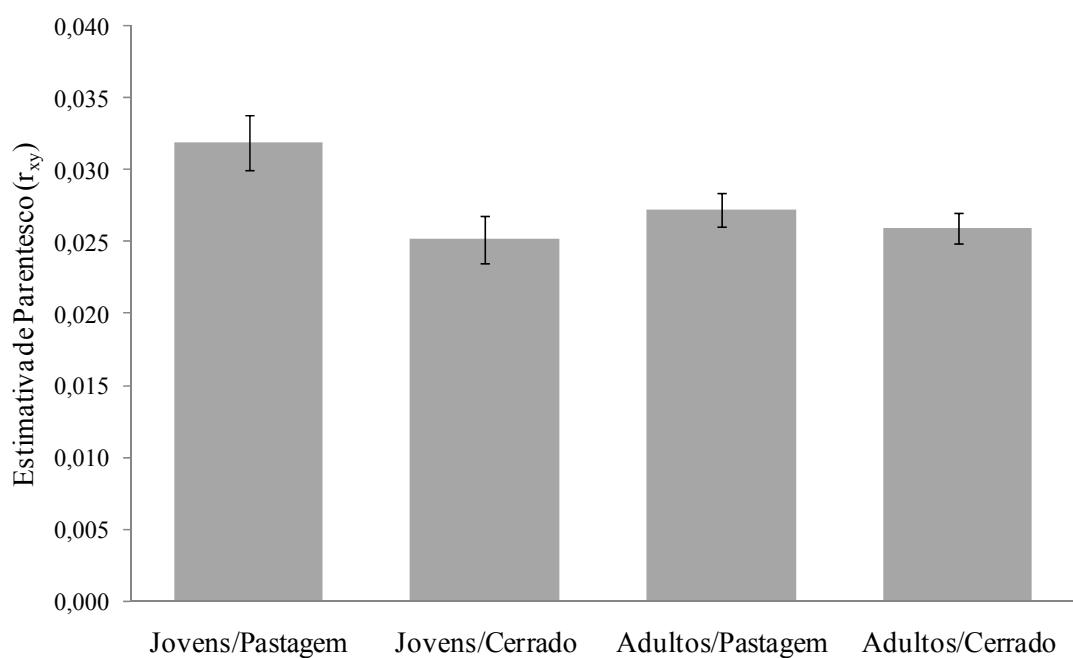


Figura 6 – Estimativas de parentesco (r_{xy}) entre pares de indivíduos de *C. brasiliense* por classes e áreas estimados a partir do coeficiente de Queller & Goodnight (1989) e distribuição de erros quasipoisson.

4 DISCUSSÃO

A diversidade e estrutura genética dos pequizeiros por habitat e classe etária não apresentaram valores estatisticamente diferentes de zero. Com isso, conclui-se que as populações de pastagem e cerrado devem ser consideradas uma única população, embora esses habitats se apresentem estruturalmente muito diferentes. A área de pastagem está localizada em uma matriz de cerrado, sendo os habitats contíguos. Com isso, supõe-se que o habitat de pastagem apresentava estrutura semelhante à observada no habitat de cerrado, se diferenciando estruturalmente em razão à ocupação humana do cerrado há cerca de 70 anos. Os resultados obtidos quanto à diversidade e estrutura genética foram assim condizentes aos esperados, já que as áreas se localizam relativamente próximas. Além disso, a alteração estrutural do habitat deve ter ocorrido em um tempo relativamente recente para que a deriva genética proporcione a redução da diversidade gênica e fixação de alelos deletérios, resultando num aumento da diferenciação gênica entre as populações. Um caso semelhante pode ser observado para *Myrciaria floribunda* em fragmentos da Mata Atlântica (Franceschinelli et al., 2007) .

No ponto de vista da genética de populações, espera-se que haja um aumento do grau de diferenciação entre populações quando isoladas (Wright, 1942). Em contrapartida, o fluxo gênico entre as populações proporciona um efeito homogeneizador na composição genética (Futuyma, 1992), como pode ser constatado no estudo da diversidade genética de *Banksia cuneata*, cuja combinação entre uma eficiente polinização por pássaros e altas proporções de retrocruzamento da espécie proporcionaram a manutenção de uma grande coesão entre suas populações de *B. cuneata* (Maguire & Sedgley, 1997). De modo geral, a troca de apenas um migrante

“efetivo” por geração em geral é capaz de prevenir fortes diferenciações entre populações, embora as freqüências alélicas possam apresentar alterações (Ellstrand & Elam, 1993). Com isso, embora as populações de *C. brasiliense* das áreas de pastagem e cerrado possuam conteúdos genéticos equivalentes, com o decorrer de gerações as populações podem apresentar aumentos significativos de diferenciação genética caso o fluxo gênico estabelecido entre as áreas esteja aquém do necessário para a manutenção de sua homogeneidade.

De modo geral, as populações naturais de pequiáceo tendem a apresentar altos níveis de heterozigosidade, sobretudo quando comparados a estudos com *Euterpe edulis*, *Cryptocarya moschata*, *Machaerium villosum* e *Cedrela fissilis* (Melo Júnior, 2003). Provavelmente este fato está associado aos hábitos de forrageamento de seus polinizadores, que visitam plantas adjacentes, tendendo a formação de demes (Collevatti et al., 2001a; Fagundes et al., 2007). Os pequiáceos adultos, pertencentes a dois habitats estruturalmente distintos devido ao estabelecimento de ações antrópicas diferenciadas, compunham originalmente uma única população análoga à área de cerrado, o que justifica a inexistência de diferenças de diversidade e estrutura genética entre as áreas.

Os resultados não evidenciaram a presença redução populacional quando analisados apenas os pequiáceos adultos das áreas, considerando apenas um habitat. Entretanto, quando analisados separadamente, a avaliação tanto da área de pastagem quanto da área de cerrado evidenciaram resultados condizentes à presença de gargalo populacional. Isso deve ser explicado devido aos indivíduos adultos das duas áreas estudadas constituírem apenas uma população, cujo habitat se estabeleceu estruturalmente diverso devido a condições de ocupação distintas. Em relação aos indivíduos jovens, os testes para evidenciar a presença de gargalo populacional foram conduzidos adotando os mesmo critérios utilizados para os pequiáceos adultos. Embora

não sejam empregadas rotineiramente análises desconsiderando indivíduos adultos, tal prática permitiu observar que os pequizeiros jovens apresentam resultados divergentes conforme o habitat. A razão de apenas os pequizeiros jovens da área de pastagem evidenciarem resultados condizentes à presença de gargalo populacional remete à possibilidade de alterações relevantes nas atividades dos polinizadores e na fenologia da planta em função do estágio sucessional (Kang & Bawa, 2003) e fragmentação do habitat (Quesada et al., 2004; Lobo et al., 2005).

O pequizeiro tende à formação de pequenas unidades panmíticas ou demes provavelmente devido a restrições de fluxo gênico (Collevatti et al., 2001a). A restrição do fluxo gênico pode ser explicada por padrões de forrageamento de seus polinizadores, que visitam o mesmo indivíduo ou grupos restritos de indivíduos (Collevatti et al., 2001a; Fagundes et al., 2007), e por dispersão de sementes (Collevatti et al., 2001a). As estimativas de parentesco médio indicaram valores significativamente mais altos de parentesco para pequizeiros jovens da área de pastagem do que de cerrado. Uma possível explicação para os resultados obtidos remetem a alterações na fenologia dos pequizeiros. Assim a estrutura do habitat de pastagem poderia ter alterado os padrões fenológicos da espécie, tornando-os assincrônicos em relação às áreas de cerrado adjacentes, restringindo consequentemente o fluxo gênico entre habitats. A restrição de fluxo gênico possibilitaria um maior número de cruzamento de indivíduos parentados, estabelecendo um aumento nos níveis de parentesco entre os indivíduos. Em casos de fragmentação de habitat, em que há restrição de fluxo gênico, maiores níveis de endogamia puderam ser constatados para *Tabebuia cassinoides* (Sebbenn et al., 2000), *Euterpe edulis* (Conte, 2004) e *Myrciaria floribunda* (Franceschinelli et al., 2007).

Com isso, os resultados obtidos sugerem que alterações na estrutura de habitat podem conduzir a alterações na diversidade e estrutura genética de *C. brasiliense*, bem como em seus níveis de parentesco. Tais alterações devem ser explicadas pelos efeitos

negativos de habitats perturbados sob o comportamento de polinização dos morcegos (Quesada et al., 2003) e de alterações nos padrões fenológicos da espécie devido ao estágio sucessional (Fagundes et al., 2007). Como consequência, espera-se que as populações de *C. brasiliense* estabeleçam níveis cada vez mais elevados de diferenciação genética, caso haja número de indivíduos suficientes para a manutenção da viabilidade das populações e se mantenha o distúrbio sofrido pela população da área de pastagem.

5 CONCLUSÃO

As populações de pequizeiros não apresentaram valores estatisticamente diferentes de zero quanto à variabilidade e estrutura genética em nenhuma condição estudada. Com isso, embora os habitats sejam bastante distintos estruturalmente, a áreas compõem apenas uma população de *C. brasiliense*.

Não houve constatação da presença de gargalo populacional. Todavia, evidenciaram-se resultados divergentes em relação aos pequizeiros jovens entre habitats, o que supostamente aponta à uma possível disrupção entre áreas. Tal disrupção deve estar relacionada a alterações nas atividades dos polinizadores e na fenologia da planta em função da estrutura do habitat.

Alterações na estrutura do habitat parecem conduzir a um aumento significativo nos níveis de parentesco em populações *C. brasiliense*, que devem ser explicados pela ocorrência de uma maior incidência de endogamia, em função de certa assincronia fenológica entre os pequizeiros dos habitats de pastagem e de cerrado.

As populações de *C. brasiliense* das áreas de pastagem e cerrado, embora possuam conteúdos genéticos equivalentes, com o decorrer de gerações devem apresentar aumentos significativos de diferenciação genética caso o distúrbio sofrido pela população da área de pastagem seja ininterrupto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. M. et al. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 3, n. 4, Out, 2007, p. 289-298, 2007.
- ANDRIANOELINA, O. et al. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 4, Abr., 2006, p. 1109-1128, 2006.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution.**: Sinauer Associates, 2004. 684 p.
- AZEVEDO, N. C. R. et al. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged Amazonian timber species. **Journal of Heredity**, v. 98, n. 7, Nov-Dez, 2007, p. 646-654, 2007.
- BACHMANN, K. Molecular markers in plant ecology **New Phytologist**, v. 126, n. 3, p. 403-418, 1993.
- BAWA, K. S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, San Francisco, v. 28, p. 85-92, 1973.
- BESNARD, G. et al. Spatial genetic structure in the Laperrine's olive (*Olea europaea* subsp *laperrinei*), a long-living tree from the central Saharan mountains. **Heredity**, v. 99, n. 6, Dez, 2007, p. 649-657, 2007.
- CHARLESWORTH, D. & CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 237-268, 1987.
- CHASE, M. et al. Microsatellite Markers for Population and Conservation Genetics of Tropical Trees. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 1, p. 51-57, 1996.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v. 23, p. 72-84, 1969.
- COLES, J. F. & FOWLER, D. P. Inbreeding in neighboring trees in two white Spruce populations. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 25, n. 1, p. 29-34, 1976.
- COLLEVATTI, R. G. et al. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based of variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 349-56, 2001a.
- _____. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, n. 1, p. 60-67, 2001b.

CONTE, R. Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozínicos e microssatélites. 2004. 124 f. Tese de doutorado (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, Fev/2004.

CRAWLEY, M. J. **Statistical Computing: An Introduction to Data Analysis using S-Plus**. Baffins Lane, Chichester, West Sussex: Jonh Willey & Sons Ltd., 2002 p. 761.

DAYANANDAN, S. et al. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, n. 10, p. 1585-92, 1999.

DE ROCHAMBEAU, H. et al. Measuring and Managing Genetic Variability in Small Populations. **Annales Zoologici**, v. 49, p. 77–93, 2000.

DE YOUNG, R. W. & HONEYCUTT, R. L. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management.*, v. 69, n. 4, p. 1362-1384, 2005.

DI RIENZO, A. et al. Mutational process of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 91, p. 3166-3170, 1994.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. **Focus**, Doyle. J. J; Doyle. J. L. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. Focus, 12:13-15., v. 12, p. 13- 15, 1990.

ELLSTRAND, N. C. Gene flow of pollen: implication for plant conservation genetics. **Oikos**, Lund, v. 63, p. 77-86, 1990.

ELLSTRAND, N. C. & ELAM, D. R. Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217-42, 1993.

FADY, B. et al. Genetic consequences of past climate and human impact on eastern Mediterranean *Cedrus libani* forests. Implications for their conservation. **Conservation Genetics** v. 9, n. 1, Fev, 2008, p. 85-95, 2008.

FAGUNDES, M. et al. Efeitos do estágio sucessional do habitat na fenologia do pequi (Caryocar brasiliense: Caryocaraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. supl. 1, p. 144-146, 2007.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análises Genéticas**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1996

FOSTER, R. B. Heterogeneity and Disturbance in Tropical Vegetation. In: SOULÉ, M. E. & WILCOX, B. A. (Ed.). **Conservation Biology: An Evolutionary - Ecological Perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980. p. 75-91.

FRANCESCHINELLI, E. V. et al. The genetic diversity of *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae) in Atlantic Forest fragments of different sizes. **Journal of Tropical Ecology**, v. 23, n. 361–367, 2007.

FRANKHAM, R. Conservation Genetics. **Ann. Rev. Genetics**, n. 29, p. 305-27, 1995.

FRANKHAM, R. et al. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press 2002

FRANKLIN, I. R. Evolutionary change in small populations. In: SOULÉ, M. E. & WILCOX, B. A. (Ed.). **Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980. p. 135-150.

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631 p.

GAIOTTO, F. A. et al. Genetic Structure, Mating System, and Long-Distance Gene Flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v. 94, n. 5, p. 399-406, 2003.

GOLDSTEIN, D. B. & SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and application**. Oxford: Oxford University Press, 1999. 352 p.

GOUDET, J. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>>.

GOUDET, J. et al. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v. 144, p. 1933-1940, 1996.

GRIBEL, R. **Ecologia da Polinização e da Dipersão de Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae) na Região do Distrito Federal**. Brasília: Universidade de Brasília, 1986

GRIBEL, R. & HAY, J., D. Pollination Ecology of Caryocar brasiliense (Caryocaraceae) in Central Brazil Cerrado Vegetation. **Journal of Tropical Ecology**, v. 9, n. 2, p. 199-211, 1993.

GRODZICKER, T. et al. Physical mapping of temperature-sensitive mutation of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 39, p. 439-446, 1974.

HALL, P. et al. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in tropical tree, *Pithecelobium elegans*. **Conservation Biology**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 757-768, 1996.

HAMRICK, J. L. The Distribution of Genetic Variation Within and Among Natural Plant Populations. In: (Ed.). **Genetic and Conservation**. London: The Benjamin/Cumming Publishing Company, 1983. p. 335-48.

HAMRICK, J. L. & NASON, J. D. Gene flow in forest trees. In: YOUNG, A. et al (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: Csiro Publishing, 2000. p. 21-36.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B. & SCHLÖTTERER, C. (Ed.).

Microsatellites: Evolution and application. Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 2-9.

HANSON, T. R. et al. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 8, abr, 2008, p. 2060-2073, 2008.

ISAGI, Y. et al. Genetic and reproductive consequences of forest fragmentation for populations of *Magnolia obovata*. **Ecological Research**, v. 22, n. 3, Mai, 2007, p. 382-389 2007.

KANG, H. & BAWA, K. S. Effects of Successional Status, Habitat and Pollinators on Flowering Patterns in Tropical Rain Forests Trees. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 6, p. 865-876, 2003.

KARASAWA, M. M. G. et al. Mating system of Brazilian *Oryza glumaepatula* populations studied with microsatellite markers. **Annals of Botany**, v. 99, n. 2, Fev, 2007, p. 245-253, 2007.

KIMURA, M. "Stepping-stone" model of population. **Annual Report of the National Institute of Genetics**, Japão, v. 3, p. 62-63, 1953.

KIMURA, M., CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, p. 725-738, 1964.

KONUDA, A. et al. Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 11, p. 1843-52, 2000.

LI, Y.-C. et al. Microsatellites: Genomic Distribution, Putative Functions and Mutational Mechanisms: a Review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-65, 2002.

LIRA, C. F. et al. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, Dezembro, p. 3219-25, 2003.

LOBO, J. A. et al. Effects of Pollination by Bats on the Mating System of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) Populations in the Two Tropical life Zones in the Costa Rica. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 370-76, 2005.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998

LOWE, A. et al. **Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application**: Blackwell Publishing, 2004. 326 p.

LUIKART, G. et al. Distortion of allele frequency distribution provides a test for recent population bottlenecks. **The American Genetic Association**, v. **The American Genetic Association**, v. 89, p. 238-247, 1997.

MACARTHUR, R. H. & WILSON, E. O. **The theory of island biogeography**. Princeton: Princeton University Press, 1967. 203 p.

MAGUIRE, T. L. & SEDGLEY, M. Genetic diversity in Banksia and Dryandra (Proteaceae) with emphasis on Banksia cuneata, a rare and endangered species. **Heredity**, v. 79, p. 394-401, 1997.

MARQUARDT, P. E. et al. Genetic structure, diversity, and inbreeding of eastern white pine under different management conditions. **Canadian Journal of Forest Research- Revue Canadienne de Recherche Forestiere** v. 37, n. 12, Dez, 2007, p. 2652-2662, 2007.

MELO JÚNIOR, A. F. **Variabilidade genética em populações naturais de pequi-eiro (Caryocar brasiliense Camb.) caracterizada por meio de isoenzimas**. 2003. 82 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado), Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 21/02/2003.

MOONEY, H. A. et al. The Study of the Physiological Ecology of Tropical Plants: Current Status and Needs. **BioScience**, v. 30, n. 1, Janeiro, p. 22-26, 1980.

MORGANTE, M. & OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.

MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalised chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

O'BRIEN, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proc. Nati. Acad. Sci**, v. 91, p. 5748-5755, 1994.

O'HANLON, P. C. et al. A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology **Weed Research**, v. 40, n. 3, p. 239-254, 2000.

OHTA, T. & KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetical Research Cambridge**, v. 22, p. 201-204, 1973.

PAKKAD, G. et al. Genetic diversity and differentiation of *Quercus semiserrata* Roxb. in northern Thailand revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 3-4, mar, 2008, p. 1067-1077, 2008.

PIRY, S. et al. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

PRANCE, G. T. & SILVA, M. F. **A monograph of Caryocaraceae**. New York: OFN, 1973. v. 12. 75 p.

PRITCHARD, J. K. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

QUELLER, D. C. & GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v. 43, n. 2, p. 258-275, 1989.

QUESADA, M. et al. Effects of forest fragmentation on pollinator activity and consequences for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated Bombacaceous Trees. **Biotropica**, v. 36, n. 2, p. 131–138, 2004.

_____. Effects of habitat disruption on the activity of nectarivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a dry tropical forest: implications for the reproductive success of the neotropical tree *Ceiba grandiflora*. **Oecologia**, v. 135, n. 3, p. 400-406, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna 2008.

RAFALSKI, J. A. et al. Generating and using DNA markers in plants. **Analysis of nonmammalian genomes: a practical guide**, p. 75-134, 1996.

RAPOSO, A. et al. Genetic diversity structure of crabwood in Baixo Acre, brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, Set, 2007, p. 1291-1298, 2007.

RAYMOND, M. & ROUSSET, F. GENEPOP: population genetics software for exacts tests. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REED, D. H. & FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, v. 17, p. 230–237, 2003.

RITLAND, K. MARK - Marker inferred relatedness and quantitative inheritance program. Vancouver: University of British Columbia: Programa distribuído gratuitamente pelo autor no site <http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>, 2004.

SCRIBNER, K. T. et al. Comparative Analysis of Intra- and Interpopulation Genetic Diversity in *Bufo bufo*, Using Allozyme, Single-locus Microsatellite, Minisatellite, and Multilocus Minisatellite data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 737-748, 1994.

SEBBENN, A. M. et al. Effects of the management on the genetic structure of caixeta (*Tabebuia cassinoides*) populations. **Scientia Forestalis**, v. 58, n. 127-143, 2000.

SEOANE, C. E. S. et al. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 57, p. 123-139, 2000.

SETSKUO, S. et al. Population differentiation and gene flow within a metapopulation of a threatened tree, *Magnolia stellata* (Magnoliaceae). **American Journal of Botany**, v. 94, n. 1, Jan, 2007, p. 128-136, 2007.

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

_____. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987.

SOULÉ, M. E. & GILPIN, M. E. Minimum viable populations: process of species extinction. In: SOULÉ, M. E. (Ed.). **Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 1986. p. 19-34.

SOULÉ, M. E. & KOLM, K. A. **Research priorities for conservation biology**. Whashington: Island Press, 1989

SOULÉ, M. E. & WILCOX, B. A. Conservation Biology: Its Scope and Its Challange. In: SOULÉ, M. E. & WILCOX, B. A. (Ed.). **Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980a. p. 151-170.

_____. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: SOULÉ, M. E. & WILCOX, B. A. (Ed.). **Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980b. p. 151-170.

TAMAKI, I. et al. Genetic variation and differentiation in populations of a threatened tree, *Magnolia stellata*: factors influencing the level of within-population genetic variation. **Heredity**, v. 100, n. 4, abr, 2008, p. 415-423, 2008.

TAUTZ, D. Hypervariabilty of simple sequences as a general source for polymorfic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-553, 2004.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WHITE, G. & POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 9, Setembro, p. 851-60, 1997.

WILLIAMS, D. A. et al. Genetic diversity and spatial structure of a keystone species in fragmented pine rockland habitat. **Biological Conservation**, v. 138, n. 1-2, Ago, 2007, p. 256-268, 2007.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorfisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.

_____. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, n. 114, p. 114-138, 1942.

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

YOUNG, A. et al. **Forest conservation genetics: principles and pratice**. Collingwood: Csiro Publishing, 2000. 352 p.

YOUNG, A. & BOYLE, T. J. B. Forest fragmentation. In: YOUNG, A. et al (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and pratice**. Collingwood: Csiro Publishing, 2000. p. 21-36.

YOUNG, A. G. et al. Genetic Structure of Fragmented Populations of the Endangered Daisy *Rutidosis leptorrhynchoides*. **Conservation Biology**, v. 13, n. 2, Abril, p. 256-65, 1999.