

Universidade Estadual de Montes Claros
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas

Diversidade e Estrutura Genética de *Attalea vitrivir* Zona (Arecaceae) em áreas fragmentadas

Ronald Rafael Moreira Santos

Montes Claros, Minas Gerais

2013

Ronald Rafael Moreira Santos

Diversidade e Estrutura Genética de *Attalea vitrivir* Zona (Arecaceae) em Áreas Fragmentadas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros como requisito necessário para a conclusão do curso de Mestrado em Ciências Biológicas.

Prof. Dr. Marcio Antonio Silva Pimenta - Orientador- UNIMONTES

Dr. Marcelo Mattos Cavallari - Co-orientador – EMBRAPA Cocais

Prof^a. Márcia Regina da Costa – UNIMONTES

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais incentivadores desde o princípio e verdadeiros exemplos de superação.

“Deus não só joga dados. Ele as vezes nos confunde jogando-os onde ninguém os pode ver.”

Stephen Hawking

Sumário

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	3
<i>Amostragem</i>	3
<i>Extração e Amplificação</i>	5
<i>Análises Estatísticas</i>	6
RESULTADOS	8
<i>Diversidade Genética</i>	8
<i>Estrutura Genética de Populações</i>	9
DISCUSSÃO	12
CONCLUSÕES	15
AGRADECIMENTOS	16
REFERÊNCIAS	16

Diversidade e Estrutura Genética de *Attalea vitrivir* Zona (Arecaceae) em Áreas Fragmentadas

RESUMO

Attalea vitrivir (sinonímia: *Orbignya oleífera*) é uma das seis espécies de palmeira, família Arecaceae, conhecidas popularmente como “babaçu”. Essa espécie tem sido explorada na indústria cosmética, alimentícia e é utilizada também para a produção de detergentes e óleos, devido ao alto teor de óleo nas sementes. Atualmente encontra-se distribuída em fragmentos situados entre o extremo sul da Bahia e Centro norte mineiro. Essa fragmentação tem efeito sobre processos ecológicos, e também genéticos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade e estrutura genética de populações em seis áreas de *A. vitrivir*, divididas em duas regiões (norte e sul), de modo a promover um maior entendimento dos fatores que operam na distribuição e particionamento de sua diversidade. Considerando o conjunto das áreas foram utilizados 9 iniciadores ISSR, que identificaram 74 fragmentos 100% polimórficos, considerando o conjunto das áreas. Os valores de diversidade encontrados foram considerados altos (IS: 0,37 a 0,47; Hs: 0,25 a 0,34). As AMOVAs realizadas mostraram um grau considerável de diferenciação entre as áreas (30,03%) e regiões (12,08%), entretanto a maioria da diversidade ainda encontra-se dentro das áreas (69%). Além disso, foi identificada maior diferenciação entre as áreas da região norte quando comparada as da região sul. Ressalta-se assim, o valor da conectividade entre as áreas e da efetividade de propostas de conservação, pois as áreas da região sul, que obtiveram menor diferenciação, encontra-se dentro da Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros – MG. O número de populações reais, $K = 2$, encontrada pelo programa Structure corrobora os resultados encontrados pelas AMOVAs e sugere a formação de duas áreas distintas condizentes com as regiões (norte e sul) delimitadas no trabalho. Os resultados preliminares sugerem que a área norte, excluída da APA, deve ser incluída nos futuros planos de manejo para a espécie. Além disso, outros estudos que contemplem sistema de cruzamento, polinização e dispersão de *A. vitrivir* deverão ser conduzidos com o intuito de corroborar os resultados obtidos no presente estudo.

Palavras – Chave: Babaçu, Fragmentação e ISSR.

Diversity and Genetic Structure in Fragmented Areas of *Attalea vitrivir* Zone (Arecaceae)

ABSTRACT

Attalea vitrivir (synonym: *Orbignya oleifera*) is one of six species of palm, Arecaceae family, popularly known as "babassu". This species has been explored in cosmetics, food and is also used for the production of detergents and oils, due to the high oil content in the seeds. It is currently distributed in fragments located between the southern Bahia and center-north of Minas Gerais. This fragmentation has no effect on ecological processes, and also genetic. This study aimed to evaluate the genetic diversity and structure of populations in six areas of *A. vitrivir* divided into two regions (north and south), so as to promote a greater understanding of the factors that operate in the distribution and partitioning of diversity. Considering all the areas, 9 ISSR primers were used being identified 74 fragments 100% polymorphics. The diversity values were considered high (IS: 0.37 to 0.47; Hs: 0.25 to 0.34). The AMOVAs tests revealed a considerable degree of differentiation between areas (30,03%) and regions (12,08%), however most of the diversity is still within the areas (69%). Furthermore, we identified greater differentiation between areas of northern in comparison to the southern region. It is highlighted, so the value of connectivity between areas and the effectiveness of proposed conservation areas for the southern region, which had lower differentiation lies within the Environmental Protection Area of Rio Pandeiros - MG. The real number of populations, $K = 2$, found by the program Structure corroborates the results found by AMOVAs and suggests the formation of two distinct areas consistent with the regions (north and south) bounded at work. Preliminary results suggest that the area north excluded of the APA, should be included in future management plans for the species. In addition, other studies that include mating system, pollination and dispersion *A. vitrivir* should be conducted in order to corroborate the results obtained in the present study.

Key - Words: Babassu, Fragmentation and ISSR.

INTRODUÇÃO

O processo de fragmentação do ambiente existe naturalmente, mas tem sido intensificado pela ação humana (Rimbaldi e Oliveira, 2003), através do uso e conversão da terra para pastagens e agricultura extensiva, gerando um mosaico de fragmentos de diversos tamanhos inseridos em matriz transformada (Arroyo-Rodríguez et al., 2007). Essa fragmentação tem efeito sobre processos ecológicos (Couvét, 2002), e também genéticos (Lowe et al., 2005). Pois uma vez isoladas as populações remanescentes em cada fragmento sofrem diferentemente os efeitos do isolamento em menor ou maior grau através de taxas diferenciadas de deriva, endogamia e seleção (Rimbaldi e Oliveira, 2003).

Um dos principais modelos conceituais, que explicam como ocorre a subdivisão de populações grandes e randomicamente organizadas foi desenvolvido por Wright (1946). Loveless e Hamrick (1984) mostram a influência desse modelo e, sobretudo, de atributos ecológicos de cada espécie para dinâmica de organização dos genótipos, ressaltando a importância de fatores como: fluxo gênico, sistema reprodutivo e dispersão.

A estruturação espacial dos genótipos é outro desdobramento do processo de isolamento e da atuação conjunta da mutação, seleção e deriva, os quais operam dentro do contexto histórico e biológico de cada espécie (Loveless e Hamrick, 1984). Nesse contexto, os parâmetros de diversidade e estrutura genética mensurados a partir de análises com marcadores moleculares são ferramentas para esclarecimento de fatores biológicos inerentes a espécie, de divergência entre populações, fluxo alélico e reduções nos níveis de diversidade (Frankham et al., 2002). Essas informações juntamente com características biológicas da espécie podem fornecer subsídios para programas de

conservação de germoplasma e definição de Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs, sigla em inglês) e/ou Unidades de Manejo (Eizirik, 1996).

Como ferramentas auxiliares para acesso de informações genéticas tornou-se amplamente utilizável marcadores moleculares (Frankham et al., 2002; Nybom, 2004). Dentro da classe de marcadores derivados da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) destaca-se o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), desenvolvido por Zietkiewicz et al. (1994). Este marcador apesar de dominante tem um baixo custo de operação, pois não requer conhecimento do genoma da espécie alvo e apresenta grande quantidade de fragmentos com grande reprodutibilidade (Brandão et al., 2011). Devido a essas vantagens, marcadores ISSR tem sido usados em diversos trabalhos de caracterização genética, estimativas de diversidade, análises de similaridade intra e interespecífica, avaliação de impactos das mudanças ambientais, como a fragmentação, na variabilidade genética e conservação das espécies (Brandão et al., 2011; kozyrenko et al., 2011; Gaiero et al., 2011).

Attalea vitrivir (sinonímia: *Orbignya oleifera*) é uma das seis espécies de palmeira, família Arecaceae, que é conhecida popularmente como “babaçu” (Lorenzi et al., 2010). Apresenta grande importância socioeconômica, pois é integralmente aproveitada pelas famílias que vivem da agricultura de subsistência associada a sua exploração. Sua importância social é ainda maior porque a exploração do produto ocorre no período de entressafra das principais culturas regionais (Lucena, 2008). Além disso, devido a sementes apresentarem alto teor de óleo, este tem sido empregado na indústria cosmética, alimentícia, de detergentes e lubrificantes (Lima, et al., 2007). Apesar da grande relevância essa espécie apresenta distribuição restrita do noroeste mineiro ao sul da Bahia em campos de pastagem antes ocupados por florestas de galeria e cerrados (Lorenzi et al., 2010).

Em virtude da distribuição geográfica restrita dessa espécie o presente estudo realizou a caracterização genética de *A. vitrivir*, utilizando marcadores ISSR, em seis áreas ao longo de um eixo norte-sul entre extremos de sua ocorrência geográfica, com a finalidade de responder as seguintes questões: (i) Como está distribuída a variabilidade genética entre e dentro das áreas de estudo? (ii) Há isolamento genético entre as áreas e/ou regiões? (iii) As áreas que estão protegidas pela Área de Proteção Ambiental abrigam, efetivamente, parcela representativa da diversidade genética encontrada? Tais respostas têm como finalidade principal subsidiar possíveis programas de conservação e amostragem dos recursos genéticos, haja vista as potencialidades econômicas da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O trabalho foi realizado em seis áreas de babaquais localizadas entre os municípios de Januária-MG e Cocos – BA, Brasil, representando um eixo norte-sul ao longo da distribuição geográfica da espécie, conforme Lorenzi et al., 2010 (Figura 1). Inspeções preliminares de campo evidenciaram duas regiões de ocorrência principais, separadas por de cerca de 90 km, nos quais não foi registrada a ocorrência da espécie. Assim, a amostragem foi realizada nessas duas regiões, uma ao norte (isto é, ao sul da Bahia e extremo norte de Minas Gerais), e outra mais ao sul (centro-norte de Minas Gerais). Essas duas regiões foram, para efeito de simplificação, denominadas Norte (N) e Sul (S).

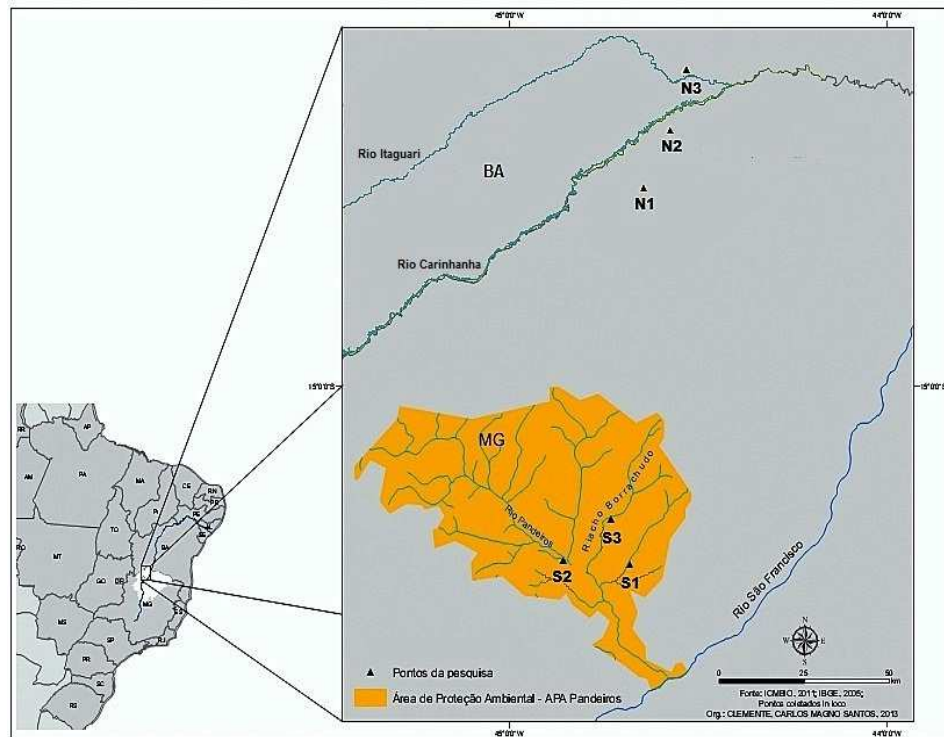


Figura 1: Localização das seis áreas de coleta entre centro-norte de Minas Gerais e extremo Sul da Bahia. A área em laranja corresponde à Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros – MG (APA – Pandeiros).

Em cada uma das regiões foram amostradas três áreas de ocorrência de *A. vitrivir* (Figura 1). As áreas da região Norte distam em média 22,4 Km, sendo a distância mínima de 16,5 Km entre N₂ e N₃ e a máxima de 33,6 Km entre N₁ e N₃. Na região Sul as áreas encontram-se mais próximas, comparadas as do norte, com distância média de 16,3 Km, mínima de 12,9 entre S₁ e S₃, e máxima 18,6 Km. As áreas da região Sul estão localizadas dentro da Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros – MG, que abrange os municípios de Januária, Cônego Marinho e Bonito de Minas (Nunes et al., 2009). Em cada população foram amostrados entre 12 (S₃) e 30 indivíduos (N₃), média de 20 indivíduos por área (Tabela 1). A coleta foi realizada respeitando uma distância mínima de 50 metros entre os indivíduos.

Tabela 1: Áreas, localização das áreas, número de indivíduos coletados em cada área (N) e a descrição de cada área com relação à extensão relativa, disposição dos babaçus e uso da terra.

Área	Localização	N	Descrição
N ₁	Montalvânia - MG (14° 31' 34,0"S; 44° 38' 38,8"W)	20	Área com poucos babaçus muito espaçados, que dividem espaço com outras espécies arbóreas.
N ₂	Montalvânia - MG (14° 23' 12,7"S; 44° 34' 25,5"W)	22	Área com maior quantidade de babaçus comparada a N ₁ e matriz circundante mais alterada. Porém apresenta aglomerados menores de babaçu ao seu redor que pode promover a conexão entre esta e N ₃ .
N ₃	Cocos - BA (14° 14' 45,6"S; 44° 31' 27,8"W)	30	Apesar de apresentar-se em matriz alterada para pastagem e ser de menor porte em relação as áreas situadas dentro da APA, está próxima do Rio e é circundada por vários outros aglomerados de babaçuais em seu entorno.
S ₁	Januária - MG (15° 25' 26,7"S; 44° 40' 55,0"W)	22	Área com presença de extrativismo, gado e fogo. Com babaçus dispostos de modo mais espaçado, pois é uma área da APA constituída por fazendas.
S ₂	Januária - MG (15°24' 54,5"S; 44° 51' 17,8"W)	20	Área maior e mais conservada do que S ₁ , com extensa cobertura de babaçus dentre outras espécies vegetais.
S ₃	Bonito de Minas - MG (15° 19' 01,3"S; 44° 43' 45,5"W)	12	Área com pequena ilha de babaçuais bastante agrupados, mas que apresenta matriz alterada ao redor e em fragmentos em seu interior, sugerindo o uso para pastagens.

Extração e Amplificação do DNA

Para a extração de DNA, folhas jovens de indivíduos adultos foram coletadas, etiquetadas e armazenadas em sílica gel. Posteriormente, as amostras foliares foram conduzidas até o Laboratório de Genética da Conservação da Universidade Estadual de Montes Claros, onde foram transferidas para freezer (-20°C) até o momento da extração de DNA.

Na extração do DNA foi utilizado o protocolo descrito por Machado et al.,(2002). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Gene Amp PCR System 9700, sendo constituída da seguinte combinação de reagentes: Tampão PCR 10x (500mM de Tris-HCl, 200mM de KCl, pH 8.0), 0,17mM de dNTPs, 1,25Mm de MgCl₂, 1,7mM de iniciador e 1U de Taq DNA polimerase, 10ng de DNA e água ultra pura. Foi utilizada a técnica ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) Zietkiewicz et al.,(1994) e os iniciadores encontram-se descritos na Tabela 2.

Após uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; as reações foram submetidas a 35 ciclos de amplificação iguais para todos os iniciadores. Cada ciclo consistiu de 94°C por 1 minuto, 30 segundos a 47°C e um minuto a 72°C. Ao final do último ciclo, foi realizada a extensão final por sete minutos, a 72°C. Os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida (5%) em eletroforese vertical. A coloração foi realizada utilizando nitrato de prata e revelada com carbonato de sódio, conforme descrito em Benbouza et al., (2006). O tamanho dos fragmentos foi estimado em comparação com um marcador molecular (“DNA ladder”) de 50pb.

Análises Estatísticas

O Conteúdo Informativo de Polimorfismo foi estimado pela metodologia descrita por Bhat (2002). Com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2001), foi calculado o número ótimo de bandas, que revela quantas bandas seriam necessárias para que os resultados das análises pudessem ser generalizados com segurança para as áreas estudadas.

Utilizou-se o Índice de Diversidade de Shannon como medida de variabilidade genética dentro das populações, calculado por meio do software POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1997).

Para verificação de como está particionada a variabilidade genética entre e dentro de regiões e áreas de amostragem, foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA), através do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2006). Foram realizadas quatro AMOVAS, uma considerando-se todas as 6 áreas de amostragem (AMOVA 1) em um único grupo; outra considerando-as divididas segundo as regiões onde se inserem, isto é, norte ou sul (AMOVA 2); e outras duas considerando cada região separadamente.

Para verificar a existência de correlação entre distância genética e distância geográfica foi realizado o teste de Mantel através do programa NTSYS (Rohlf, 2001), utilizando a divergência genética bayesiana θ^B entre pares de populações, fornecida pelo programa HICKORY 1.0 (Holsinger e Lewis, 2003). Este programa também forneceu informações sobre a diversidade genética intrapopulacional (h_s) e total (H_t) análogas ao índice de diversidade genética de Nei (1973). Os valores foram extraídos do modelo estatístico mais adequado de acordo com o *Deviance Information Criterion* – DIC (mais detalhes em Holsinger e Lewis, 2003).

A atribuição de cada indivíduo a uma população, com base no seu genótipo, foi feita pelo programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al., 2000). Dez simulações independentes foram feitas para cada valor de número de agrupamentos K (K de 1 a 10), no qual o programa posiciona os indivíduos no número definido de grupos com base em suas semelhanças nas frequências alélicas. Em cada simulação, foram feitas 100.000 iterações com um descarte inicial (*burn-in*) de 100.000 iterações. Assumiu-se modelo de mistura, com frequências alélicas não correlacionadas. Como indicador do número real de populações utilizou-se a taxa de mudança no logaritmo de probabilidade dos dados ΔK (Evanno et al., 2005).

RESULTADOS

Diversidade Genética

O número de fragmentos amplificados por iniciador variou de 4 (UBC 829) a 11 (UBC 845 e Terry), totalizando 74 fragmentos. A porcentagem de locos polimórficos variou de 84% (S_3) a 93% (S_2), sendo que todos os marcadores foram polimórficos quando considerado o conjunto de todas as áreas avaliadas. Os valores de conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC) para cada iniciador variaram de 0,41 (Terry) a 0,50 (UBC 814), com média final de 0,45 (Tabela 2), demonstrando que todos são satisfatórios em revelar as diferenças genéticas entre os indivíduos. A análise de número ótimo de bandas revelou serem necessários pelo menos 68 fragmentos para que, conforme Silveira et al., (2003) os resultados pudessem ser confiavelmente extrapolados da amostra para a área total analisada.

Tabela 2: Identificação do iniciador, seqüência de nucleotídeos, Número de fragmentos e Conteúdo Informativo de Polimorfismo respectivamente para os iniciadores utilizados.

Iniciadores	Seqüências	Nº de Fragmentos	PIC
UBC 807	5' (AG) ₈ T 3'	9	0,42
UBC 813	5' (CT) ₈ T 3'	8	0,45
UBC 814	5' (CT) ₈ A 3'	7	0,50
UBC 829	5' (TG) ₈ C 3'	4	0,49
UBC 834	5' (AG) ₈ YT 3'	8	0,47
UBC 840	5' (GA) ₈ YT 3'	8	0,46
UBC 845	5' (CT) ₈ RG 3'	11	0,41
UBC 857	5' (AC) ₈ YG 3'	8	0,45
TERRY	5' (GTG) ₄ RC 3'	11	0,41
		74 (Total)	0,45(Média)

O Índice de Diversidade de Shannon, IS, (Tabela 3) variou de 0,38 ($\pm 0,26$) para a área N₃ a 0,52 ($\pm 0,19$) para área S₁. A média de todas as seis áreas foi 0,57 ($\pm 0,13$). O índice de diversidade intrapopulacional (hs) e o índice de diversidade genética total (Ht) foram calculados pelo programa HICKORY e demonstraram o mesmo padrão visto em

IS (Tabela 3). O modelo estatístico mais adequado para essas análises foi o “Fullmodel” (DIC = 1867,48).

Tabela 3: Índice de Shannon (IS), diversidade genética intrapopulacional (hs) e heterozigosidade total (Ht), baseada na média das frequências alélicas. Os valores entre parênteses correspondem aos respectivos desvios padrão.

Áreas	IS	Hs
N1	0,3965(0,24)	0,2878(0,010)
N2	0,4221(0,25)	0,3007(0,008)
N3	0,3774(0,26)	0,2590(0,008)
S1	0,5164(0,19)	0,3406(0,013)
S2	0,4753(0,25)	0,3309(0,011)
S3	0,3953(0,27)	0,3004(0,011)
IS total	0,5650 (0,13)	
Ht		0,41(0,009)

Estrutura Genética de Populações

A Análise de Variância Molecular (AMOVA 1) demonstrou que cerca de 30% do total de variabilidade genética amostrada se devem às diferenças entre as populações (Tabela 4). Quando se consideraram também as regiões de amostragem (norte e sul), a nota-se que as diferenças entre populações dentro de regiões são responsáveis por cerca de 20% do total de variabilidade genética amostrada, enquanto que as diferenças entre as regiões são responsáveis por cerca de 10% (Tabela 5). Por fim, as amovas por região revelaram que há maior diferenciação dentro da região norte ($\Phi_{ST}= 0,31$) do que dentro da região sul ($\Phi_{ST}= 0,22$) (Dados não apresentados). Em todos os casos, a maior parte da variabilidade genética amostrada encontra-se entre indivíduos dentro de populações.

Tabela 4: Resultado da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para *A. vitrivir*, considerando-se os níveis hierárquicos de populações (áreas de coleta) dentro de regiões e indivíduos dentro de populações (AMOVA 1).

Fonte de Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	% da Variação	P	Estatística Φ
Entre populações	5	394,65	30,03	(<0,0001)**	$\Phi_{ST} = 0,3003$
Entre indivíduos dentro de populações	119	955,574	69,97	(<0,0001)**	$1-\Phi_{ST} = 0,6997$
TOTAL	124	1350,224	100,00		

** altamente significativo.

Tabela 5: Resultado da AMOVA para *A. vitrivir*, considerando-se os níveis hierárquicos e de regiões (norte e sul), populações (áreas de coleta) dentro de regiões e indivíduos dentro de populações (AMOVA 2).

Fonte de Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	% da Variação	P	Estatística Φ
Entre regiões	1	151,795	12,08	(<0,0001)**	$\Phi_{CT} = 0,1208$
Entre populações dentro de regiões	4	242,855	21,39	(<0,0001)**	$\Phi_{SC} = 0,2139$
Entre indivíduos dentro de populações	119	955,574	66,53	(=0,1) ^{ns}	$1-\Phi_{ST} = 0,6653$
TOTAL	124	135,022	100,00		

** altamente significativo; ns não significativo

O Teste de Mantel revelou não haver correlação entre as distâncias genéticas (θ^B) e geográficas ($r = 0,47$; $p = 0,07$). As análises feitas pelo programa STRUCTURE, seguidas da estimativa de ΔK baseada em Evanno et al., (2005) (Figura 2) indicam que o número mais provável de populações reais é duas ($K=2$), seguido por $K = 3$, que

apesar de não apresentar maior ΔK é também um valor alto comparado aos subseqüentes. Quando $K = 2$ é assumido observa-se que os dois grupos formados correspondem às regiões Norte e Sul delimitadas em nosso trabalho, com as áreas S_3 e N_1 apresentando um maior percentual de mistura (Q) quando comparadas as outras áreas das suas respectivas regiões (Figura 3A). Já em $K=3$ é possível perceber a separação de N_1 das outras áreas do estudo (Figura 3B).

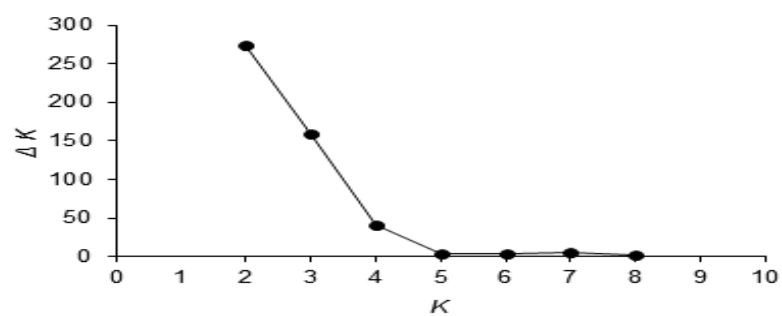


Figura 2: Indicador de número real de populações, ΔK corresponde a taxa de mudança do logaritmo de probabilidade fornecido pela análise Bayesiana.

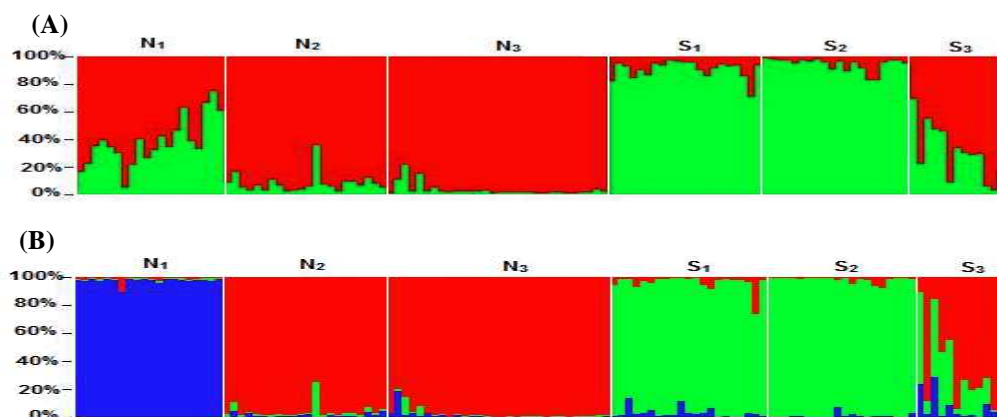


Figura 3: (A) Gráfico de barras indicando a porcentagem de mistura (Q) lado esquerdo da figura, em cada indivíduo, para o agrupamento alélico de $K = 2$. (B) Porcentagem de mistura (Q) para $K = 3$. As cores nas figuras representam o número de grupos (K) assumidos. Assim as faixas de cores dentro de cada indivíduo indicam a proporção do genoma do indivíduo que originada de cada K . Essa proporção recebe o nome de Q e está representado numericamente do lado esquerdo da figura em uma escala de 0 à 1 (detalhes vide Prichard et al., 2000).

DISCUSSÃO

Os resultados do Conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC), bem como da análise de número ótimo de bandas revelou que os iniciadores foram informativos (Botstein et al., 1980), sendo satisfatório o número de fragmentos encontrados para que pudéssemos discutir e generalizar os resultados das análises que se seguem.

Os valores de diversidade encontrados pelo Índice de Diversidade de Shannon são relativamente mais altos quando comparados aos obtidos em outras espécies que apresentam, assim como *A. vitrivir*, predominância de fecundação cruzada (Kozirenko et al, 2011), polinização por inseto e/ou vento (Han et al., 2009) e dispersão primária barocórica (Dos Santos et al, 2011). Han et al., (2009) trabalhando com *Nelumbo nucifera*, espécie polinizada por insetos, encontrou índices de diversidade variando entre 0,14 a 0,33 com média de 0,21. Kozyrenko et al., (2011) obtiveram resultados semelhantes com *Radiola rosea*, espécie arbórea, que apresentou índice de diversidade entre 0,13 e 0,25, com média de 0,29 para o conjunto das áreas analisadas. Os valores de diversidade intrapopulacional e total, calculados pelo HICKORY, também são mais altos do que valores encontrados na literatura, sendo os dois índices então congruentes apesar da diferença em seus valores absolutos.

Diversos autores afirmam que para a maioria das palmeiras com, preferencialmente, predominância de fecundação cruzada, ciclos de vida longos e grandes distâncias de dispersão de pólen, a maior parte da variabilidade está dentro das populações (Nybom, 2004; Oliveira et al., 2008). Análises de variância moleculares realizadas a partir de dados de marcadores dominantes em populações de espécies arbóreas que possuem fecundação cruzada apresentam até 28% de divergência genética entre populações (Nybom, 2004; Oliveira et al., 2008). Os resultados obtidos sugerem que esteja ocorrendo algum grau de isolamento entre as áreas de *A. vitrivir*, haja vista

que as diferenças entre populações são responsáveis por cerca de 30% da variação encontrada. A diferenciação quando consideradas as regiões norte e sul é menor (21,39%), no entanto o valor Φ_{CT} (12,08%) encontrado ainda sugere divergência genética entre as regiões. Souza (1997) trabalhando com *Chorisia speciosa* encontrou 18% de divergência entre fragmentos, considerando esse valor alto grau de divergência genética. Segundo Wright (1978), valores de Φ_{ST} de 0.15 a 0.25 são indicativos de grande diferenciação interpopulacional. Os resultados encontrados para *A. vitrivir* também refletem o seu sistema de dispersão primário, pois a baixa capacidade de dispersão (primariamente barocórica) ou até mesmo o possível ataque por animais ou insetos pode elevar a diferenciação entre as áreas (Nybom e Bartish, 2000; Loveless e Hamrick, 1984). Acrescido o fato de que espécie estudada tem distribuição geográfica restrita e apresenta-se estruturada em fragmentos (Lorenziet al., 2010).

De acordo com Gitzendanner e Soltis (2000), a fragmentação e consequente alteração da matriz entre os fragmentos podem também contribuir para o aumento da divergência entre as áreas. As análises de variância molecular realizadas separadamente dentro das regiões demonstraram esse efeito, pois na região Norte, onde conforme observações têm matriz mais alterada e fragmentada, obtivemos maior Φ_{ST} entre as áreas (0,31). Entretanto ao compararmos com a região Sul menor valor de diferenciação foi observado (0,23). Esta região compreende a as três áreas restantes, que se encontram mais conectadas, pois fazem parte da Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros. Esse resultado é corroborado por Brandão (2011), que trabalhando com *Myrcia splendens* demonstrou que a presença de corredores conectando os fragmentos favorece o fluxo entre as áreas, mantendo a distribuição randômica dos alelos. Desse modo, ele ressalta a importância da conectividade para evitar a diferenciação e estruturação genética das populações.

Os resultados obtidos nas Análises de Variância Molecular corroboram os resultados do STRUCTURE, que agrupam as seis áreas estudadas em apenas duas reais populações ($K = 2$). Esse agrupamento corresponde à delimitação regional norte e sul. Nesse contexto, acredita-se que a limitação de dispersão dos polinizadores e dispersores de frutos pode exercer uma força a favor da diferenciação, visto que a provável dispersão de frutos do babaçu é primariamente barocórica, e apesar de não existir trabalhos descrevendo o real polinizador em *A. vitrivir*, a polinização de palmeiras em geral é mediada por besouros (Silberbauer-Gottsberger, 1990), que tem capacidade de voo limitado (Han et al., 2009), incompatíveis com a distância de cerca de 90 km entre as regiões. Abreu et al., (2012) em trabalhos com *Acrocomia aculeata* (Macaúba) sugerem que a forma de distribuição agregada da palmeira pode influenciar o comportamento do polinizador, que tende a polinizar dentro dos grupos aumentando a divergência genética. Esse raciocínio pode ser aplicado para *A. vitrivir*, haja vista que as áreas de estudo encontram-se separadas pela própria fragmentação da paisagem, já bastante pronunciada no bioma Cerrado (Klink e Machado, 2005) no qual estão situadas as áreas de coleta.

Além disso, no $K=3$ (Figura 3B) pode confirmar a subestruturação proposta pelas análises de variância feitas separadamente em cada uma das regiões, mostrando que para *A. vitrivir* o principal fator de diferenciação é a restrição do fluxo gênico seja pelas capacidades dispersivas do fruto e polinizador; e/ou pela distância e conectividade entre as populações. Na escala regional esse isolamento pela distância fica bastante evidente, já a importância da qualidade dos fragmentos e conectividade entre eles é notada quando comparamos os resultados do percentual de mistura dentro das regiões norte e sul.

Conforme Moritz, (1994) por meio de informações de frequências alélicas nucleares ou mitocondriais é possível traçar estratégias de conservação de curto e longo prazo, a partir da delimitação de, respectivamente, Unidades de Manejo (MUs, sigla em inglês) e/ou Unidades Evolucionárias Significativas (ESUs, sigla em inglês). Os dois tipos de unidades, a despeito das divergências conceituais que as permeiam, apresentam a mesma finalidade: reconhecer áreas com divergência significativa nas frequências alélicas, que conseqüentemente remetem-nos a possíveis especializações locais. Desse modo, pode-se afirmar que as seis áreas de ocorrência natural de *A. vitrivir* formam duas Unidades de Manejo distintas, correspondentes às regiões delimitadas nesse estudo. Evidenciando, que a APA – Pandeiros (Região Sul) não detém a totalidade da diversidade genética encontrada para *A. vitrivir*, sendo necessária então a incorporação da região norte nos planos de manejo da espécie.

CONCLUSÕES

Os níveis de diversidade genética encontrados para *A. vitrivir* foram considerados de moderado a alto, quando comparada a outras espécies que apresentam sistemas de cruzamento e dispersão semelhantes. Contudo foi evidenciada a existência de diferenciação entre as áreas e regiões delimitadas no estudo, confirmado a existência de duas Unidades de Manejo distintas, que correspondem às regiões delimitadas (norte e sul). Houve uma maior diferenciação intra-regional nas áreas da região norte, quando comparada às divergências encontradas na região sul, destacando a importância da preservação da conectividade entre as áreas. No entanto, apesar da maior conectividade nas áreas situadas no interior da APA- Pandeiros, esta não detém a totalidade da diversidade genética encontrada na espécie, sendo necessária a incorporação da região norte nos planos de manejo e conservação. Por fim, outros trabalhos serão necessários para avaliar a verdadeira influência de forças evolutivas como fluxo e deriva em

progênies, de modo a revelar os efeitos atuais dessas forças nos níveis e particionamento da diversidade. Além disso, estudos ecológicos que contemplem sistema de cruzamento, distâncias de dispersão e polinização são necessários para melhor compreensão e aplicação das estratégias de manejo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG pelo custeio do projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de mestrado concedida. Agradeço de modo especial também ao Márcio Lisboa Guedes e Paulo H. G. Ferreira pelo apoio em campo; e Carlos Magno Clemente pela amizade e produção, especialmente para esse trabalho, da figura de delimitação das áreas de estudo.

REFERÊNCIAS

Abreu GA, Priolli RHG, Azevedo-Filho JA, Nucci SM, et al. (2012). The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 35: 119-121.

Arroyo-Rodríguez V, Aguirre A, Benítez-Malvido J, Mandujano S (2007). Impact of rain forests fragmentation on the population size of a structurally important palm species: *Astrocaryum mexicanum* at Los Tuxtlas, México. *Biological Conservation* 138:198–206.

Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin, JP, Mergeai G (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in Polyacrylamide Gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 10: 77-81.

Bhat KV (2002).Molecular data analysis.Em: Proceedings of the short-term training course on molecular marker application in plant breeding. ICAR, New Delhi, 308.

Botstein D, White RL, SkolnichM, Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American JournalofHumanGenetics. 32:314-331.

Brandão MM, Vieira FA, de Carvalho D (2011). Estrutura genética em microescala espacial de *Myrciasplendens*(Myrtaceae).RevistaÁrvore. 35:956-964.

Couvet D (2002). Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations.ConservationBiology. 16: 369-376.

Cruz CD (2001). Programa GENES: versão Windows. UFV, Viçosa.

Dos Santos MF, Silva KJD, Carvalhaes MA, Lima PSdaC (2011). Diversidade genética de populações naturais de *Orbignya phalerata* Mart. (Babaçu) por marcadores RAPD. Disponível em: [<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/920340>]

EizirikE(1996). Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. Brazilian Journal of Genetics. 19:23-29.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study.Molecular Ecology. 14: 2611–2620.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007).Arlequin: a software for population data analysisVersão 3.11. UniversityofGeneva. Disponível em: [<http://cmpg.uniube.ch/software/alerquin3>].

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002). Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.

Gaiero P, Mazzella C, Agostini G, Bertolazzi S, et al. (2011). Genetic diversity among endangered uruguayan populations of *Butia* Becc. species based on ISSR. Plant Syst. Evol. 292: 105-116.

Gitzendanner MA e Soltis PS (2000). Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. American Journal of Botany. 87: 783 –792.

Han Y-C, Teng C-Z, Wahiti GR, Zhou M-Q, et al (2009). Mating system and genetic diversity in natural populations of *Nelumbonucifera* (Nelumbonaceae) detected by ISSR markers. Plant Syst. Evol. 277: 13-20.

Holsinger KE, Lewis PO (2003). HICKORY Versão: 1.0. The University of Connecticut. Disponível em: [www/eeb.uconn.edu].

Klink CA e Machado RB (2005). Conservation of the Brazilian Cerrado. Conservation Biology. 19: 707-713.

Kozyrenko MM, Gontcharova SB, Gontcharov AA (2011). Analysis of the genetic structure of *Rhadiolarosea* (Crassulaceae) using inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms. Flora. 206: 691-696.

Lima JRO, Silva RB, Silva CCM, Santos LSS, et al. (2007). Biodiesel de Babaçu (*Orbignyasp.*) obtido por via etanólica. Química Nova. 30: 600-603.

Lorenzi, H, Noblick L, Kahn F, Ferreira E (2010). Flora Brasileira: Arecaceae (palmeira). Instituto Plantarium, Nova Odessa - SP.

Loveless MD e Hamrick, JL (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Annual Review of Ecology and Systematics. 15: 65-95.

Lowe AJ et al. (2005). Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*. 95: 255-273.

Lucena, JM (2008). Uma palmeira em muitos termos: a terminologia da cultura agroextrativista, industrial e comercial do coco babaçu Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE.

Machado FRB, Vinson CC, Silva VP, Ciampi AY (2002). Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais. Em: Anais do 53º Congresso Nacional de Botânica, Recife.

Moritz C (1994). Defining 'Evolutionarily Significant Units' for Conservation. *Tree*. 9: 373-375.

Nunes YRF, Azevedo IFP, Neves WV, Veloso, MDM, et al. (2009). Pandeiros: o Pantanal Mineiro. *BIOTA*. 2: 4-17.

Nybom H (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific diversity in plants. *Molecular Ecology*. 13:1143-1155.

Nybom H e Bartish IV (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in plantecology, evolution and systematics*. 3: 93-114.

Oliveira DA, De Paula MFB, Pimenta MAS, Braga RF, et al. (2008). Variabilidade genética de populações de fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do estado de Minas Gerais. *Rev. Árvore*. 32: 355-363.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.

Rimbaldi e Oliveira DM e de Oliveira DAS (2003). Fragmentação de ecossistemas: Causas, efeitos sobre a diversidade e recomendações de políticas públicas. MMA/SBF. Brasília – DF.

Rohlf FJ (2001). Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.11. Applied Biostatistics, New York.

Silberbauer-Gottsberger I (1990). Pollination and Evolution in Palms. *Phyton*. 30: 213-233.

Silveira SR, Ruas PM, Ruas, CF (2003). Assessment of genetic variability within and among populations coffee progenies and cultivars using RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*. 26: 329-336.

Souza LM (1997). Estrutura genética de populações naturais de *Chorisisaspeciosa* StHil. Em fragmentos florestais na região de Baruaru, SP, Brasil. Tese de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.

Wright S (1946). Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*. 31: 39-59.

Wright S (1978). Evolution and genetics of populations variability within and among populations. University of Chicago Press, Chicago.

Yeh FC, Yang, RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao, JX (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology centre.

Edmonton: University of Alberta. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.

Acessado em 30 de out. 2011.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics*.20:1