



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS - PPGCB



Ligiany Gravoche Sousa

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS
DE *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius (Areaceae)

Montes Claros- Minas Gerais
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS - PPGCB



Ligiany Gravoche Sousa

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS
DE *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius (Arecaceae)

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
Orientador: Prof. Dr Dario Alves de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Afrânio Farias de M. Júnior

Montes Claros- Minas Gerais
2012

*A todos aqueles que me ajudaram na elaboração deste trabalho e a todos seus
leitores.
Dedico*

Agradecimentos

À Deus por ter me ajudado a seguir em frente com obstinação, esforço, paciência e paixão pelo conhecimento, das quais, sem alguma delas, esta caminhada teria sido muito mais árdua.

À Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) e ao Departamento de Ciências Biológicas, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), pela orientação que necessitei. Aos professores do PPGCB pelos ensinamentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Aos professores Dr. Dario e Dr. Afrânio, pelos ensinamentos, pela confiança, convivência e pelo carinho que tiveram por mim durante esses dois anos.

Às professoras Dr^a Patrícia e Dr^a Elytânia por todos os ensinamentos, sugestões, apoio, incentivo, presença em todas as etapas da realização desse trabalho e pela amizade.

Aos membros da banca avaliadora (ao Dr. Pedro Ivo Vieira Good God e ao Dr. Rodrigo Oliveira Pessoa) pela participação e pelas valiosas correções e sugestões para o enriquecimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos.

A Leide por todo apoio, conversas, incentivos e pela amizade.

Aos amigos e colegas do mestrado, em especial aos amigos de minha turma pela convivência e pelos momentos compartilhados (bons e maus)...

Ao meu companheiro de viagens Betão, pelos momentos de descontração.

Ao meu amigo Wesley pela descontração no laboratório.

A todos os meus amigos, os quais eu não preciso citar nomes, pois sabem quem são e estão em meu coração!! Aos que estiveram presente fisicamente, aos que estiveram ausentes fisicamente!! Obrigada por existirem na minha vida e por me fazer sentir tão especiais pra vocês!!

Em especial a Hellen, Luiz Fernando e Júlia que tanto torceram por mim e aturaram meus momentos de stress. A Maria Fernanda que além da amizade muito me ensinou sobre genética.

A todos os meus familiares, que estiveram torcendo e rezando por mim nessa etapa, sempre compreendendo a minha ausência nos encontros de família.

Ao Bento, meu eterno amor, companheiro, amigo. Essa vitória também é sua.

A mamãe e papai pessoas simples, mas que sempre me apoiaram na busca pelo conhecimento.

Aos meus irmãos Lane, Jú e Igor que sempre se orgulharam dessa irmã mais velha, e que sempre me deram força pra seguir em frente. Obrigada por sempre terem estado presente na minha vida, mesmo na ausência física! Vocês fazem parte demais nessa minha vitória. Amo vocês família.

Aos meus lindos e maravilhosos sobrinhos Gustavo, Lívia e Aisla por cada sorriso que me proporcionaram.

E a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta para a minha formação e conclusão deste trabalho,

MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!

Sumário

	Páginas
Lista de Figura.....	vii
Lista de Tabela.....	viii
1- Introdução Geral	1
2- Referências.....	6
Artigo: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Martius (Arecaceae).....	7
Resumo.....	8
1- Introdução.....	9
2- Material e Métodos.....	11
2.1- Locais de coleta.....	11
2.2- Amostragem, extração de DNA e reações de amplificação.....	12
2.3- Amplificação do DNA com primers SSR.....	14
2.4- Análises estatísticas dos dados.....	15
3- Resultados.....	17
4- Discussão.....	25
5- Conclusão.....	31
6- Referências.....	32

Lista de Figuras

Páginas

Introdução Geral

Figura 1: *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. Ex Martius (Arecaceae): A - Planta; B - Inflorescência; C - Fruto. (Fonte: a autora).....3

Figura 2: Comparação entre capacidade de produção de óleo vegetal de algumas oleaginosas.....4

Artigo

Figura 1: Localização geográfica das cinco populações de *Acrocomia aculeata* amostradas no norte do Estado de Minas Gerais, Brasil.....12

Figura 2: Posição e distribuição espacial dos indivíduos de *A. aculeata* nas cinco populações estudadas na região Norte do Estado de Minas Gerais.....13

Figura 3: Dendrograma UPGMA das populações de *C. brasiliense* amostradas, calculado de acordo com a identidade genética de Nei (Nei, 1978).....20

Figura 4: Representação do número provável de populações distintas de *A. aculeata*, de acordo com a metodologia de Falush, Stephens e Pritchard, (2003).....21

Figura 5: Distribuição dos 150 indivíduos de *A. aculeata* nos grupos de acordo com a análise do Structure (k=5), baseado em marcadores microssatélites.....22

Figura 6: Representação da atribuição dos genótipos para cada população.....23

Figura 7: Correlogramas do coeficiente de coancestria (*kinship*), por classes de distância, para indivíduos de *A. aculeata* nas populações naturais amostradas no estado de Minas Gerais.....25

Lista de tabelas

Páginas

Tabela 1: Populações amostradas de <i>Acrocomia aculeata</i> no Norte do Estado de Minas	11
Tabela 2: Matriz de distância geográfica entre as populações de <i>Acrocomia aculeata</i> , em quilômetros.....	12
Tabela 3: Sequências dos pares de primers desenvolvidos para amplificar loci microssatélites de <i>A. aculeata</i>	14
Tabela 4: Parâmetros de diversidade genética das cinco populações de <i>Acrocomia aculeata</i> baseadas em quatro locos microssatélites.....	18
Tabela 5: Estrutura genética das oito populações de <i>Acrocomia aculeata</i> baseada na análise de variância das frequências alélicas e no tamanho dos alelos para quatro locos microssatélites.....	18
Tabela 6: Valores de diferenciação genética (θ) (diagonal superior) par a par para as cinco populações de <i>A. aculeata</i> , baseada na análise de quatro locos microssatélites e a distância geográfica (em Km) (diagonal inferior) entre as populações.....	19
Tabela 7: Valores de LnP (D) após 10 corridas independentes para cada valor de K.....	21
Tabela 8: Matriz de distância geográfica entre as populações de <i>A. aculeata</i> , em quilômetros.....	23
Tabela 9: Caracterização da estrutura espacial de <i>A. aculeata</i> nas cinco populações.....	25

1- Introdução Geral

O bioma Cerrado ocupa 23,92% do território brasileiro, com uma extensão total de 2.036.448 km² (IBGE, 2007). A flora do Cerrado está entre as mais ricas do mundo, sendo estimada, segundo Avidos e Ferreira (2000), em 10 mil espécies, com um grande número de espécies ainda pouco estudadas, de alto potencial alimentar, madeireiro, combustível, agroindustrial, forrageiro, medicinal e ornamental. No entanto, com a degradação desse bioma, em virtude da expansão agrícola e do extrativismo predatório de espécies frutíferas, o Cerrado tem sofrido intensa redução da extensão de sua vegetação. As consequências do aumento de áreas fragmentadas nesse bioma, com mais de 50% da sua extensão original antropizada (Dros, 2004) tem sido foco de pesquisas em ecologia, genética entre outras. Portanto, as espécies nativas do Cerrado são alvo de várias abordagens de estudos, não somente por esse bioma ser um dos *hotspots* mundiais de diversidade, mas também para que os conhecimentos adquiridos possam ser aplicados na sua gestão.

Para que programas de conservação de recursos naturais sejam implementados de forma efetiva, parâmetros pertinentes a cada espécie devem ser considerados, tais como informações ecológicas, referentes ao padrão de distribuição das espécies arbóreas, estrutura genética de suas populações, grau de erosão genética e fatores determinantes da variação genética das espécies. Estas informações devem ser obtidas de forma a prevenir a extinção de populações locais de espécies arbóreas.

Além de estudos a respeito da ecologia e biologia das espécies, estudos genéticos também devem ser considerados em programas de conservação, uma vez que estes estudos propiciam informações sobre padrões das populações, como distribuição da diversidade genética, fluxo gênico, taxas de cruzamento, dentre outras. Tais

informações são extremamente relevantes, uma vez que o potencial genético das espécies é primordial para a sua evolução.

Técnicas da biologia molecular são empregadas para obtenção de informações sobre aspectos genéticos das espécies vegetais, uma vez que os marcadores moleculares são uma importante ferramenta para descrever os padrões de variabilidade genética de uma população natural e entre populações naturais. Existem vários tipos de marcadores moleculares, que se diferenciam em função da metodologia empregada com a finalidade de se detectar a variabilidade genética das espécies, tais como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e as baseadas na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites, também conhecida com SSR (*Simple Sequence Repeats*) além do ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Uma das técnicas desenvolvidas para estudar diferenças entre sequências de DNA é a baseada nos marcadores codominantes microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs). Esses marcadores são constituídos por sequências curtas de DNA repetidas em *tandem* dispersas por todo genoma de eucariotos, e também são encontradas em procariotos. Devido à codominância e à natureza altamente polimórfica, as sequências simples repetidas de DNA são cada vez mais utilizadas como marcadores genéticos de escolha para análises de genética populacional e também mapeamento de genomas (Tautz, 1989; Ellegren, 2004; Ellis & Burke, 2007).

As análises com marcadores SSR fornecem dados sobre vários parâmetros evolutivos, que incluem níveis de variação genética, níveis de endogamia, autofecundação versus cruzamento, tamanho efetivo populacional e estrutura genética espacial de populações. Desse modo, além de fornecer informações básicas evolutivas, os marcadores SSR também são uma ferramenta importante para desenvolvimento de

estratégias de manejo, conservação e uso sustentável de espécies (White et al., 1999; Hedrick, 1999; Ellis & Burke, 2007; Ciampi et al., 2008).

A macaúba, *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. Ex Martius (Arecaceae) (Figura 1), é uma das inúmeras espécies nativas do cerrado que apresentam grande potencial de utilização. No Estado de Minas Gerais, ocorrem grandes populações de macaúba, consideradas como economicamente promissoras (Motta *et al.*, 2002). Essa palmeira é utilizada para diversos fins, principalmente como fonte de alimentos e artesanato, por moradores de comunidades tradicionais (Lorenzi, 2006). O valor econômico representado pela macaúba pode ser avaliado em função das amplas possibilidades de seu aproveitamento integral. O estipe é freqüentemente utilizado no meio rural na confecção de calhas, moirões ou ripas. As folhas são empregadas como forrageira animal nos períodos de seca, além de matéria-prima para a produção de linhas, de cordas e de redes. Do pecíolo são confeccionados cestos, balaios e chapéus. Os espinhos, duros e resistentes, prestam-se como alfinetes para rendeiras (Silva, 1994).



Figura 1: *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. Ex Martius (Arecaceae): A - Planta; B - Inflorescência; C - Fruto. (Fonte: a autora)

O recurso economicamente mais expressivo da macaúba é a extração de óleo vegetal para a produção de biodiesel e na indústria cosmética. De acordo com estimativas, a macaúba produz até quatro mil litros de óleo por hectare/ano (figura 2). Essa oleaginosa supera culturas anuais como soja (420L), girassol (890L) e a mamona (1.320L), (Cesar, 2003). A potencialidade econômica da macaúba está aliada ao manejo sustentável devido ao fato dessa oleaginosa ser uma planta endêmica e perene, com benefícios para manejo e conservação do solo. A macaúba possui uma alta produtividade de matéria prima, necessita de pouca água e necessita de trabalho manual na colheita dos frutos, com isso evita o êxodo rural garantindo assim, emprego as populações em sua região de origem.

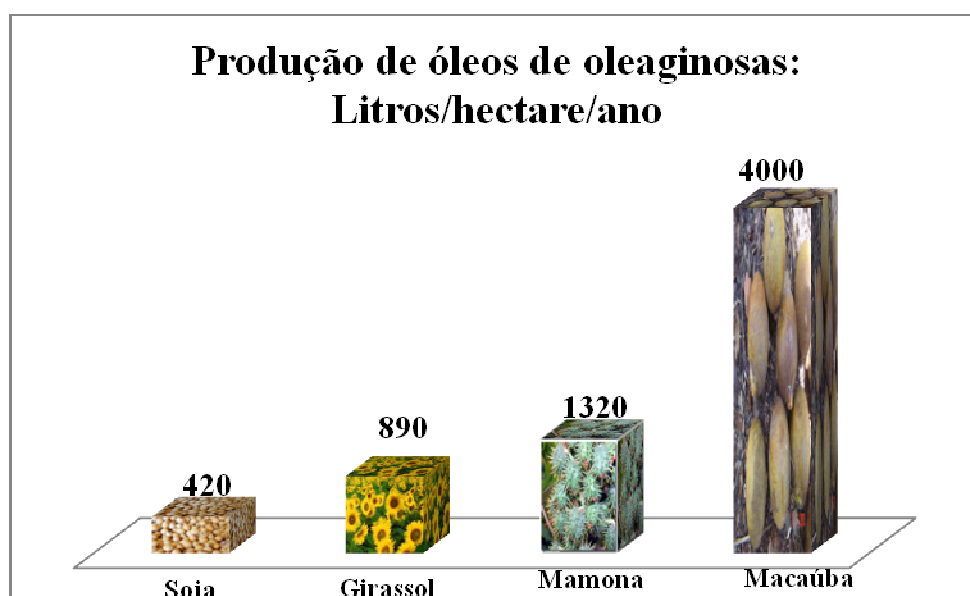


Figura 2 – Comparação entre capacidade de produção de óleo vegetal de algumas oleaginosas.

Considerando que o conhecimento a níveis genéticos, tais como estrutura e diversidade genética entre populações naturais, é importante para adoção de iniciativas de manejo e conservação, o objetivo deste trabalho foi o de obter informações sobre a diversidade e estrutura genética de populações naturais do *A. aculeata* distribuídas no

Estado de Minas Gerais para a indicação de possíveis unidades operacionais. De forma específica, buscou-se neste trabalho:

- i) quantificar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações naturais;
- ii) determinar a estrutura genética intra e interpopulacional;
- iii) conhecer o padrões de distribuição espacial das populações.

2- Referências

- Avidos, M. F. D.; Ferreira, L. T. Frutos do cerrado: preservação gera muitos frutos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n. 15, jul-ago 2000. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio15/frutos.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2012.
- Cesar, E. Biodiesel no tanque. *Pesquisa Fapesp*, São Paulo, 94 ed., dez. 2003.
- Ciampi, A.Y.; Azevedo, V.C.R.; Gaiotto, F.A.; Ramos, A.C.S.; Lovato, M.B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. *Molecular Ecology Resources*, v.8, p.1074–1077, 2008.
- Dros, J. M. Administrando os Avanços da Soja: Dois Cenários de Expansão do Cultivo da Soja na América do Sul. Amsterdã: AIDEnvironment,. 2004. 73 p.
- Ellegren, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, v.5, p. 435-445, 2004.
- Ellis, J.R.; Burke, J.J.M. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*, v.99, p.125–132, 2007.
- Hedrick, P.W. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, v. 53, n.2, p.313-318, 1999
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 abr. 2012-06-22
- Lorenzi, G. M. A. C., *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Curitiba, 2006, 156f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- Motta, P. E. F.; Curi, N.; Oliveira-Filho, A. T.; Gomes, J. B. V. Occurrence of macaúba in Minas Gerais, Brazil: relationship with climatic, pedological and vegetation attributes. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.37, n.7, p.1023-1031, jul. 2002.
- Silva, J. C.; Barrichelo, L. E. G.; Brito, J. O. Endocarpos de babaçu e macaúba comparados à madeira de *Eucalyptus grandis* para produção de carvão vegetal. <http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr34/cap04.pdf>, (3 setembro 2010).
- Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v.17, n. 16, 1989.
- White, G.M.; Boshier, D.H; Powell, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc.. *Molecular Ecology*, v.8, p.1899–1909, 1999.

ARTIGO: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES
NATURAIS DE *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius (Arecaceae)

ARTIGO: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius (Arecaceae)

RESUMO

Com o intenso processo de fragmentação no qual o Cerrado se encontra, a variabilidade genética das espécies deste bioma tem se tornado cada vez mais comprometida, podendo ser perdida com o avanço desse processo de degradação. Dentre estas espécies, a *Acrocomia aculeata* conhecida como macaúba, possui grande importância ecológica e econômica, nos setores alimentícios e na produção de biodiesel. Com o objetivo de caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações de *A. aculeata*, foram coletados 150 indivíduos de cinco localidades no Estado de Minas Gerais. Quatro *primers* SSR foram utilizados para obter os dados genéticos desta espécie. Os resultados indicaram que as populações estudadas apresentam significativos níveis de diversidade genética ($\hat{H}e = 0,54$), apesar do coeficiente de endogamia positivo e significativo para a maioria das populações. A significativa diferenciação entre as populações ($\theta = 0,32$ e $RST = 0,28$) evidencia a estruturação das populações. Em todas as populações, os genótipos se encontram distribuídos de forma aleatória. A partir do dendrograma, construído pelo método UPGMA, pode-se distinguir dois grupos, grupo I com a população ESP, o grupo II com as populações [(MIR, CLP), (GRM, ITA)]. Essas populações, de modo geral, apresentaram índices de endogamia altos e significativos. Os dados obtidos para *A. aculeata* mostram que a espécie e os ambientes de sua ocorrência devem ser priorizados em programas de conservação genética.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*, estrutura genética, SSR, EGE.

1- Introdução

Acrocomia aculeata (Jacq) Lodd. Ex Martius (Arecaceae) conhecida como macaúba é uma palmeira arborescente perene nativa das florestas tropicais ela é monóica, mas realiza fecundação cruzada revelando assim um sistema de cruzamento misto (Scariot *et al.*, 1995). É uma planta monocaule com presença de espinhos em toda estrutura. Sua distribuição compreende a América central e América do Sul. No Brasil, ela ocorre em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso (Markey, 1956) e no Ceará (Scariot *et al.*, 1995). Os principais polinizadores são besouros das famílias Curculionidae, Nitidulidae e Escarabaeidae (Henderson *et al.*, 1995; Scariot, 1998) e o vento atua como polinizador secundário. Seus frutos integram a dieta de araras, capivaras, antas, emas entre outros animais, que fazem o papel de dispersores (Pott; Pott, 1994).

O fruto da macaúba é uma importante fonte de matéria prima para a indústria cosmética e produção de biodiesel (Cipriano, 2006). Essa situação pode resultar em um extrativismo sem estratégias de conservação. Zucchi (2002) salienta que os recursos genéticos referentes às espécies frutíferas nativas estão sobre sério risco de ameaça devido à progressiva destruição de seus habitats. Para adotar estratégias efetivas de manejo da conservação genética é necessário conhecer a estrutura genética das populações, que envolve o conhecimento dos níveis de variabilidade genética e como esta se distribui entre e dentro das populações (Kageyama, 1987; Dias, 1991; Kageyama, 1991).

Hattemer (1991) define variação genética como a variação no número de locos polimórficos em conjunto com o número de alelos e a distribuição de sua frequência. O grau de variação genética da população e seu sistema de reprodução influenciam na

produção de indivíduos de diferentes genótipos. Através deste processo a variabilidade genética promove a matéria prima para adaptação, evolução e reprodução dos indivíduos em novas condições ambientais e doenças (Rajora & Pluhar, 2003). Um dos fatores que afetam o nível e a distribuição da variação genética em espécies de plantas é o tamanho das populações (Sun, 1996). A genética de populações prediz a perda de diversidade genética em populações que se mantêm pequenas por várias gerações (deriva genética), em populações iniciadas por um número pequeno de colonizadores (efeito fundador), e em populações que sofreram um rápido declínio no tamanho (*bottlenecks*) (Good *et al.*, 1996).

A estrutura genética de populações de uma espécie refere-se à forma como a variabilidade genética é distribuída entre e dentro das populações (Brown, 1978) e pode ser definida como a distribuição não aleatória de alelos e genótipos (Hamrick, 1987). O fluxo gênico é um componente importante na estrutura genética das espécies, por determinar a divergência genética existente entre populações. Fluxo gênico elevado entre populações tem o efeito de homogeneizar a variação genética. Quando o fluxo gênico é baixo, fatores como deriva genética, seleção e endogamia, provocam a divergência genética entre as populações (Slatkin, 1994; Hartl e Clarck, 1997; Hedrick, 2000). A fragmentação do hábitat é um fator que reduz o tamanho das populações e aumenta o isolamento espacial entre elas. Conseqüentemente, aumenta a divergência genética interpopulacional devido à deriva, ao aumento da endogamia e à redução do fluxo gênico (Young, 1996).

Considerando como o conhecimento da estrutura e diversidade genética entre populações naturais é importante para adoção de iniciativas de manejo e conservação, o objetivo deste trabalho foi quantificar a diversidade, estrutura genética e a estrutura

genética espacial (EGE) de populações naturais de *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. Ex Martius no Norte do Estado de Minas Gerais.

2. Material e Métodos

2.1 Locais de coletas

Os locais de coleta estão situados no Norte do Estado de Minas Gerais, abrangendo as regiões de ocorrência da *Acrocomia aculeata* (Figura 1), sendo denominadas de acordo com o município no qual estão inseridas (Tabela 1). Todos os indivíduos foram marcados e identificados com sistema de georeferenciamento. Por meio do método proposto por Santos e Vieira (2005), o estado de preservação das áreas amostradas foram avaliadas segundo a presença de gado, corte seletivo e incidência de fogo, com atribuição de notas de 1 a 5 para essas características. Ao final da avaliação, realizou-se a somatória das notas, onde valores maiores correspondem a maior grau de preservação (Tabela 1). A localização geográfica das cinco populações estudadas se encontra na Figura 1 e matriz de distância geográfica entre as populações está representada na tabela 2, sendo que essa distância variou de 65 a 266 km.

Tabela 1: Populações amostradas de *Acrocomia aculeata* no Norte do Estado de Minas Gerais. **n** = número de indivíduos. **P** = grau de preservação;

Populações	Códigos	n	Coordenadas (UTM)	P
Espinosa	ESP	30	23 L 749031 8334715	3
Mirabela	MIR	30	23 K 590583 8202069	1
Grão Mogol	GRM	30	23 K 726546 8160876	2
Claro dos Poções	CLP	30	23 K 579071 8129806	2
Itacambira	ITA	30	23 K 682511 8113139	1
Total		150		

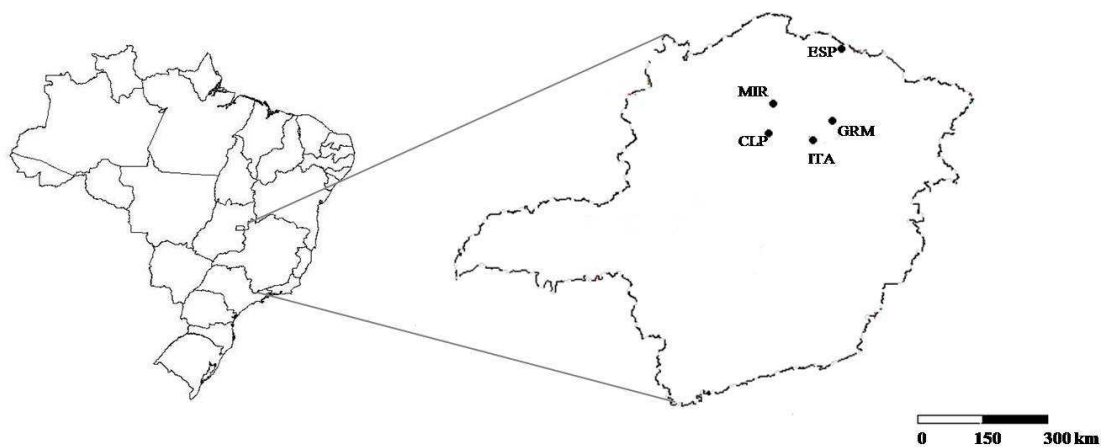


Figura 1. Localização geográfica das cinco populações de *Acrocomia aculeata* amostradas no norte do Estado de Minas Gerais, Brasil.

Tabela 2: Matriz de distância geográfica entre as populações de *Acrocomia aculeata*, em quilômetros.

	ESP	MIR	CLP	GRM	ITA
ESP	-				
MIR	207	-			
CLP	266	73	-		
GRM	175	142	150	-	
ITA	231	127	105	65	-

2.2 Amostragem, extração do DNA e reações de amplificação

Foram coletadas folhas jovens de 30 indivíduos em cada população e mantidas em sacos de plástico com sílica gel para a extração do DNA, conforme metodologia proposta por Doyle & Doyle (1990) e modificada por Faleiro *et al.* (2003). A amostragem foi realizada de forma aleatória ao longo das áreas, sem distância mínima determinada para inclusão dos indivíduos. A posição e distribuição espacial dos indivíduos de *A. aculeata* amostrados nas cinco populações estão representadas na

Figura 2, os pontos foram obtidos a partir das coordenadas UTM (*Universal Transverse Mercator*). A integridade do DNA extraído foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1%. Para as reações de amplificação do DNA foram realizadas diluições padronizadas de acordo com a quantidade de DNA extraída para todas as amostras.

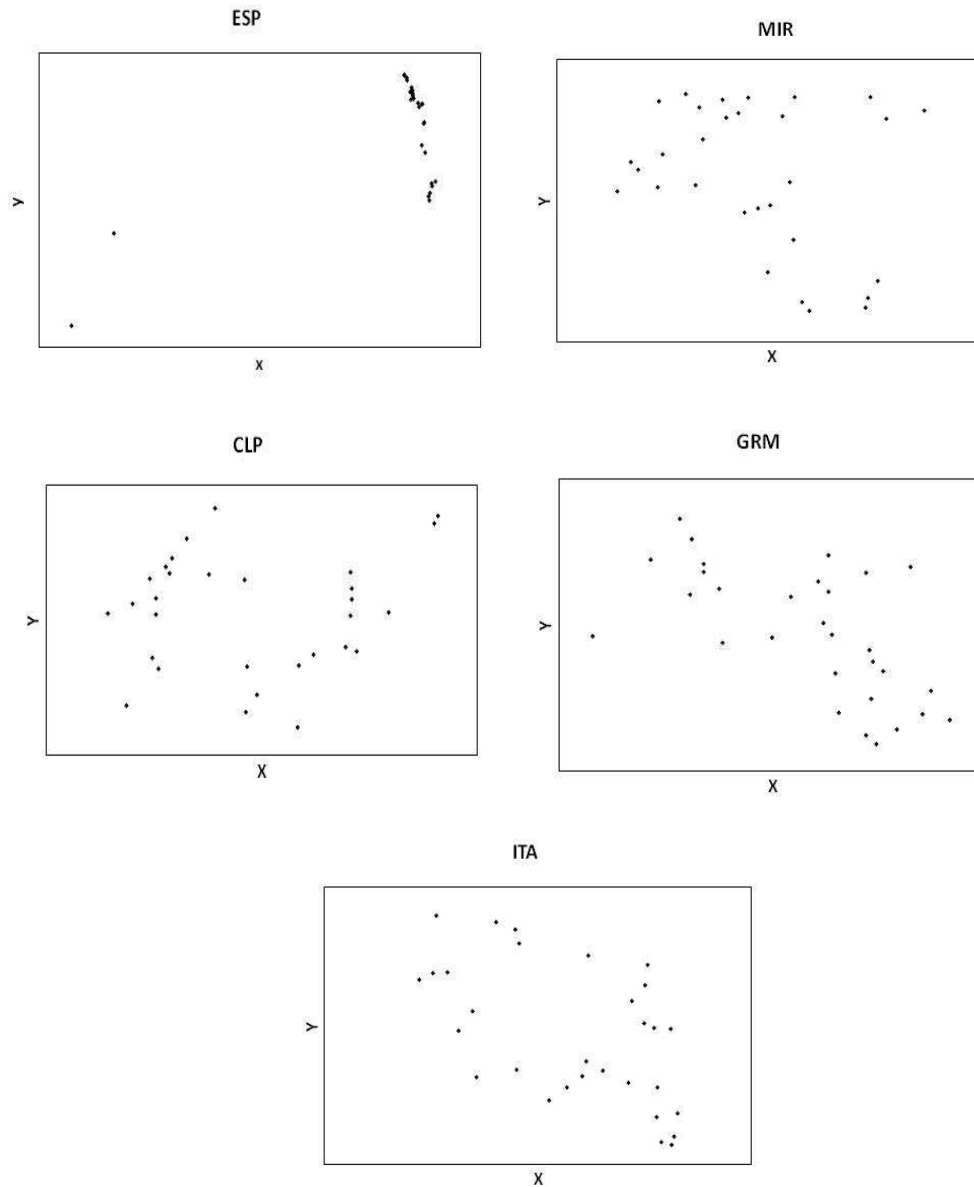


Figura 2: Posição e distribuição espacial dos indivíduos de *A. aculeata* nas cinco populações estudadas na região Norte do Estado de Minas Gerais. Populações: ESP – Espinosa, MIR – Mirabela, CLP – Claro dos Poções, GRM – Grão Mogol e ITA – Itacambira.

2.3 Amplificação do DNA com *primers* SSR

Quatro pares de *primers* de marcadores SSR desenvolvidos previamente para *Acrocomia aculeata* (Nucci *et al.*, 2007) (Tabela 2), foram usados para as análises genéticas das populações. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15µL contendo 1X do tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), 1,34µM de cada par de primer, 250µM de cada dNTPs, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 0,25mg de BSA, 1,0 mM de MgCl₂ e 3ng de DNA. As reações foram amplificadas em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*). O protocolo de PCR consistiu de uma prévia desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguida por 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min para anelamento e 72 °C por 1 min, em seguida, uma etapa de extensão final a 72°C por 30 min. Os *primers* utilizados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Sequências dos pares de primers desenvolvidos para amplificar loci microssatélites de *A. aculeata*.

Locus	Repetições	Sequências (5'- 3')	Temperatura de Anelamento (°C)
Aacu07	(GA)13	F: ATCGAAGGCCCTCCAATACT R: AAATAAGGGGACCCTCCAA	56
Aacu10	(AG)16	F: TGCCACATAGAGTGCTTGCT R: CTACCACATCCCCGTGAGTT	56
Aacu12	(TC)20	F: GAATGTGCGTGCTCAAAATG R: AATGCCAAGTGACCAAGTCC	56
Aacu26	(AC)13 (AG)14	F: ACTTGCAGCCCCATATTCAG R: CAGGAACAGAGGCAAGTTC	56

O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com o DNA de tamanho conhecido Liz 600 (*Applied Biosystem*) em sequenciador automático

de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems). Os cromatogramas produzidos foram analisados pelo programa Gene Mapper v. 4.1 (Applied Biosystems).

2.4 Análises estatística dos dados

Os níveis de variação genética dentro das populações foram quantificados por meio do número de alelos por loco (A), da heterozigosidade observada (H_o) e da heterozigosidade esperada (H_e) sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg, a distância genética de Nei (1978) e o índice de fixação de Wright (f), ambos estimados através do programa Genetic Data Analysis - GDA 1.1 (Lewis e Zaykin 2001). O desvio de Hardy-Weinberg e o teste para o desequilíbrio de ligação para os pares de locos foram testados com utilização do programa Fstat 2.9.3.2 com correção de Bonferroni (Goudet, 2002).

A estrutura genética foi estimada a partir dos coeficientes de coancestralidade de Weir e Cockerham (1984). Os coeficientes foram estimados a partir da variância das frequências alélicas dos indivíduos, sendo $F = F_{IT}$ (coeficiente de endogamia total), $f = F_{IS}$ (coeficiente de endogamia), $\theta = F_{ST}$ (índice de fixação), com utilização do programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002), baseado em 1.000 randomizações, com o nível de significância de $p \leq 0,05$ com correção de Bonferroni (Goudet *et al.* 1996).

A estruturação da variabilidade genética das populações de *A. aculeata* foi analisada, por meio de análise Bayesiana implementada pelo programa *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000). A análise supracitada considera a separação do número total de indivíduos em agrupamentos (*clusters*), com atribuição de um número K de populações e assume que há equilíbrio de Hardy - Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados dentro de cada população. Dessa forma, são definidas as populações às quais pertencem os indivíduos, sem a necessidade de uma informação

anterior sobre a localidade de origem. O modelo utilizado para esta análise foi o *admixture model*, onde cada amostra pode ter ancestrais de mais de uma população.

A diferenciação genética entre as populações também foi estimada pelo índice R_{ST} , pois em locos microssatélites o processo mutacional não está de acordo com o que se admite no modelo de alelos infinitos com baixas taxas de mutação. O R_{ST} é obtido pela análise de variância do tamanho dos alelos e pode ser interpretado como uma correlação da extensão dos alelos de diferentes indivíduos de uma mesma população (Slatkin 1995). A análise de diferenciação estimada pelo R_{ST} foi realizada segundo Goodman (1997) com a utilização do programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2002). A significância do teste de diferenciação foi estimada pela randomização dos genótipos entre as amostras para a obtenção da estatística G log-likelihood (Goudet *et al.* 1996).

Com base nos dados da diferenciação genética (θ) entre as populações foi construído um dendrograma com utilização do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*) e auxílio do programa NTSYS, versão 2.11 (Rohlf, 2000), a partir da matriz de identidade genética, calculada de acordo com Nei (1978). Para testar uma possível correlação entre distância genética (Nei, 1978) e distância geográfica (em metros) das populações foi realizado o Teste de Mantel. Essas análises foram realizadas no software *GenAlEx 6.1* (Peakall & Smouse, 2006).

Para a estimativa do coeficiente kinship (estrutura genética espacial – EGE) foi utilizado o programa Spagedi, versão 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002), considerando-se o coeficiente de endogamia igual a zero. O erro padrão da média das estimativas foi obtido por reamostragem jackknife entre locos. A partir do erro padrão da média foi construído intervalos de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente de coancestria médio estimado para cada classe de distância. Para a obtenção de classes de distância mais apuradas, estas foram definidas de forma que a proporção de todos os indivíduos

representados pelo menos uma vez em cada intervalo de distância fosse superior a 50% e que o coeficiente de variação do número de vezes que cada indivíduo é representado em cada intervalo fosse menor ou igual a um (Hardy & Vekemans, 2002). A ocorrência de estrutura genética espacial foi testada dentro de cada classe de distância com utilização de 1.000 permutações. A magnitude da estrutura genética espacial foi mensurada por meio da estatística S_p (Vekemans & Hardy, 2004), pelo seguinte cálculo: $S_p = -bF/(1 - F_1)$, em que F_1 é a média do coeficiente de coancestria (F_{ij}) dos indivíduos dentro da população na primeira classe de distância e bF é a inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria. Os valores de S_p foram utilizados para comparar a extensão da estrutura genética espacial entre as populações.

3 Resultados

Diversidade e Estrutura genética

Os quatro locos microssatélites avaliados resultaram em média 4,7 alelos por população (Tabela 3). A heterozigosidade observada (H_o) foi menor que a heterozigosidade esperada (H_e) em todas as populações. Os valores médios de H_e e H_o foram 0,539 e 0,402, respectivamente (Tabela 4). A relação entre heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada resultou em índices de fixação (f) com valores positivos e significativos nas populações ESP, MIR, CLP e GRM, e valores de f não significativos, apesar de positivos, somente na população ITA. Nenhum par de locos apresentou desequilíbrio de ligação nas populações analisadas, valores de $p > 0.000167$, baseado em 1000 permutações com correção de Bonferroni.

Tabela 4: Parâmetros de diversidade genética das cinco populações de *Acrocomia aculeata* baseadas em quatro locos microssatélites; \hat{A} - número médio de alelos por população; He - heterozigosidade esperada; Ho - heterozigosidade observada; f - coeficiente de endogamia.

População	\hat{A}	He	Ho	f
ESP	3,2	0,400	0,283	0,297*
MIR	5,5	0,644	0,393	0,392*
CLP	5,0	0,536	0,408	0,245*
GRM	5,0	0,526	0,422	0,200*
ITA	4,7	0,587	0,504	0,143
Média	4,7	0,539	0,402	0,257*

Para f valores seguidos de * são significativos, $p = 0.002$

O coeficiente de endogamia (f) e o coeficiente de endogamia total (F) foram significativos para os locos Aacu10 e Aacu12, ambos apresentaram os maiores valores. Para as estimativas f o locos Aacu7 e Aacu26 apresentaram valores negativo e positivo respectivamente, porém não significativos (Tabela 5). Todos os locos foram significativos para F , contudo, as estimativas médias de f (0,259) e de F (0,498) foram significativas para todas as populações (Tabela 4). A diferenciação entre as populações foi verificada pelos valores dos índices θ e R_{ST} que foram significativos para todos os locos, com média de 0,322 e 0,283, respectivamente.

Tabela 5: Estrutura genética das oito populações de *Acrocomia aculeata* baseada na análise de variância das frequências alélicas e no tamanho dos alelos para quatro locos microssatélites.

Loco	f	F	θ	R_{st}
Aacu7	-0.086	0.281*	0.338*	0.459*
Aacu10	0.479*	0.607*	0.245*	0.296*
Aacu12	0.444*	0.576*	0.237*	0.016*
Aacu26	0.135	0.530*	0.456*	0.341*
Para todos os locos	0.259*	0.498*	0.322*	0.283*

f - coeficiente de endocruzamento, F - coeficiente de endocruzamento total, θ - índice de fixação, R_{st} - diferenciação genética populacional baseada no tamanho dos alelos.

* $p = 0.001$, valores significativos

Diferenciação genética entre populações

Através da comparação dos valores de θ entre os pares de populações foi observada diferenciação genética significativa entre todas populações estudadas (Tabela 6), com menor diferenciação entre as populações ITA e GRM e maior entre GRM e ESP.

Tabela 6: Valores de diferenciação genética (θ) (diagonal superior) par a par para as cinco populações de *A. aculeata*, baseada na análise de quatro locos microssatélites e a distância geográfica (em Km) (diagonal inferior) entre as populações.

	ESP	MIR	CLP	GRM	ITA
ESP	0	0.393	0.420	0.515	0.434
MIR	207	0	0.171	0.247	0.237
CLP	266	73	0	0.264	0.252
GRM	175	142	150	0	0.151
ITA	231	127	105	65	0

p=0.005 todos valores significativos

A partir da matriz de identidade genética (Nei, 1978) entre as populações amostradas, construiu-se um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 3). Pela análise do dendrograma pode-se observar a formação de dois grupo: grupo I com a população ESP, o grupo II com as populações [(MIR, CLP), (GRM, ITA)].

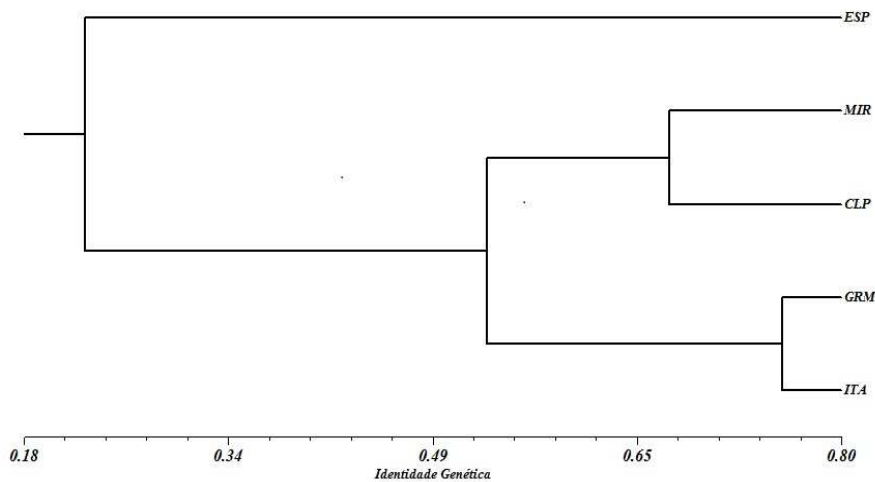


Figura 3: Dendrograma UPGMA das populações de *Acrocomia aculeata* amostradas, calculado de acordo com a identidade genética de Nei (Nei, 1978). ESP- Espinosa, MIR- Mirabela, CLP- Claro dos Poções, GRM- Grão Mogol, ITA- Itacambira.

A correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das populações mostrou que 54,5% da diferenciação genética observada entre as populações de *A. aculeata* pode ser explicada pela hipótese do isolamento por distância geográfica, mas, esse valor de correlação ($r = 0,296$) apesar de positivo não foi significativo ($p = 0,1$), segundo o teste de Mantel.

Com a análise bayesiana encontramos cinco grupos distintos ($k=5$) figura 4. Na Tabela 7 são descritos os valores de LnP (D) para cada valor de K assumido. Analisando o resultado por meio do gráfico que representa o valor Q (Figura 5), pode-se observar nitidamente a presença dos cinco grupos reais. Este valor de Q é a estimativa do coeficiente de participação de cada indivíduo em cada grupo.

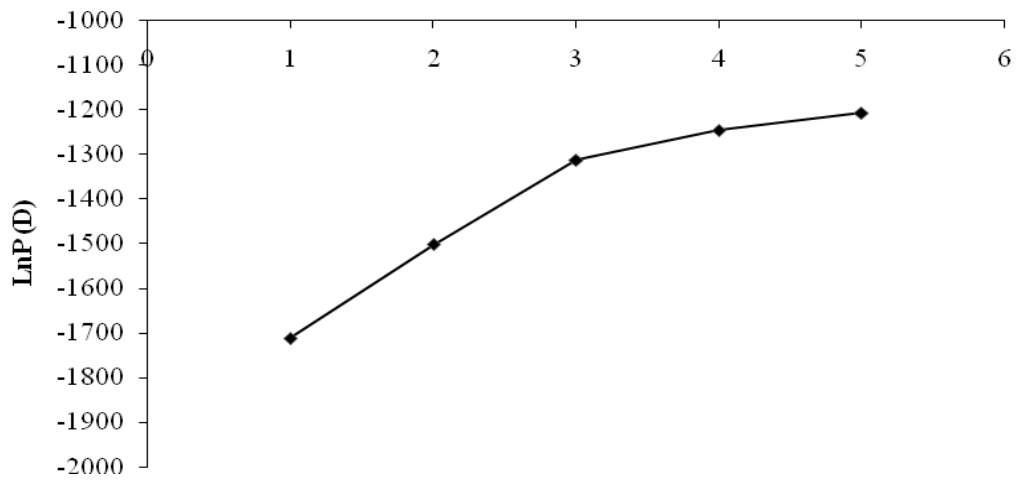


Figura 4: Representação do número provável de populações distintas de *A. aculeata*, de acordo com a metodologia de Falush, Stephens e Pritchard, (2003). LnP (D) = probabilidade log dos dados, mostrando cinco como o número provável de populações distintas.

Tabela 7: Valores de LnP (D) após 10 corridas independentes para cada valor de K.

K	LnP (D)
1	-1712,43
2	-1502,69
3	-1313,84
4	-1247,48
5	-1207,64

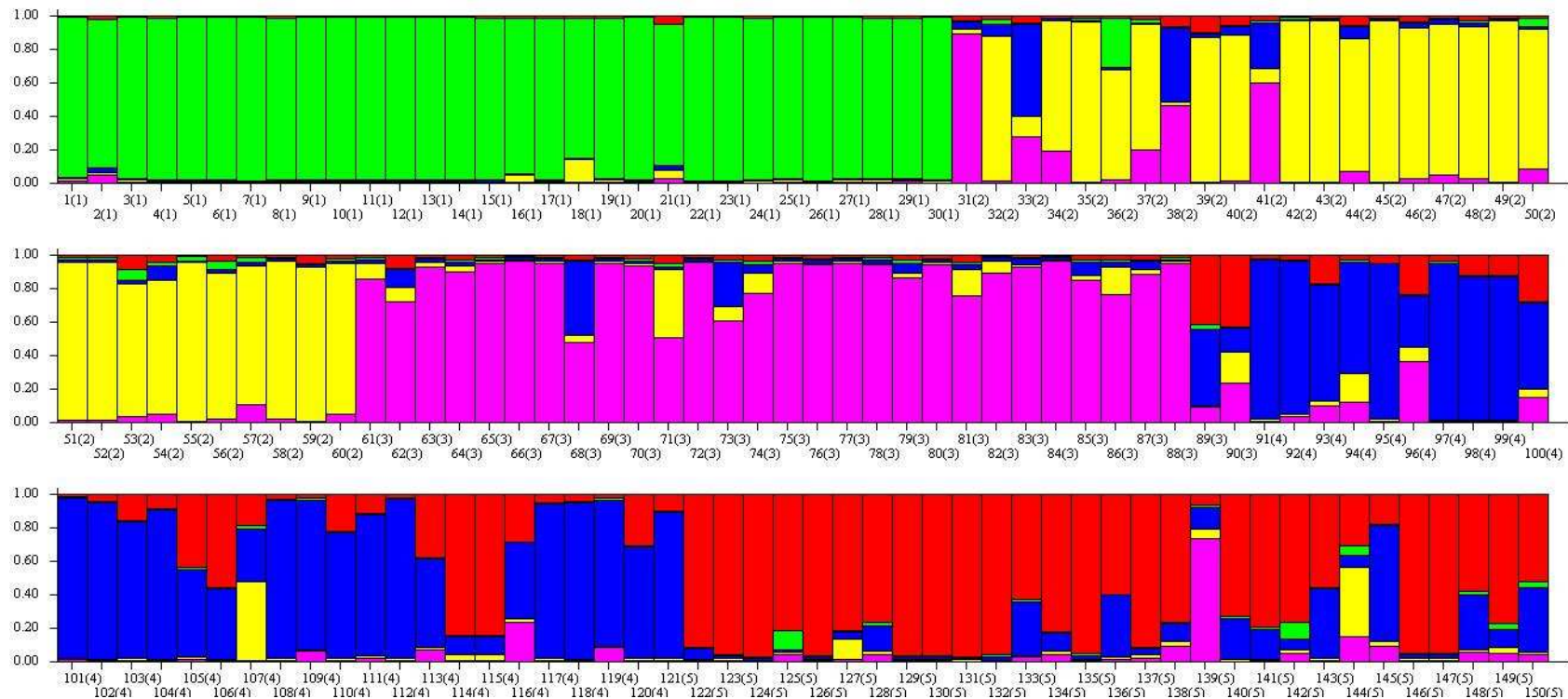


Figura 5: Distribuição dos 150 indivíduos de *A. aculeata* nos grupos de acordo com a análise do Structure ($k=5$), baseado em marcadores microsatélites. Os indivíduos estão representados por barras verticais, sendo que cada cor está associada a um grupo diferente. Eixo x = indivíduos das populações amostradas; eixo y = estimativa do coeficiente de participação de cada indivíduo em cada grupo. 1= Espinosa; 2= Mirabela; 3= Claro dos Poções; 4 = Grão Mogol; 5 = Itacambira.

A Figura 6 representa a contribuição dos genótipos para cada população. Assim, pode-se notar que as populações 4 e 5 compartilham maior quantidade de alelos, isso se deve provavelmente pela pequena distância geográfica entre elas (Tabela 8).

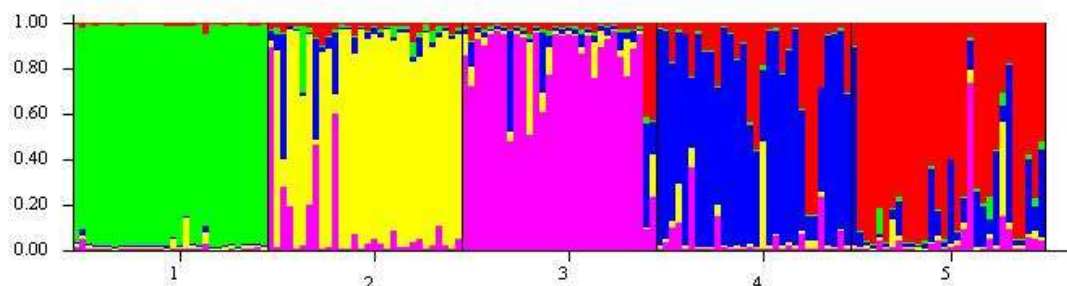


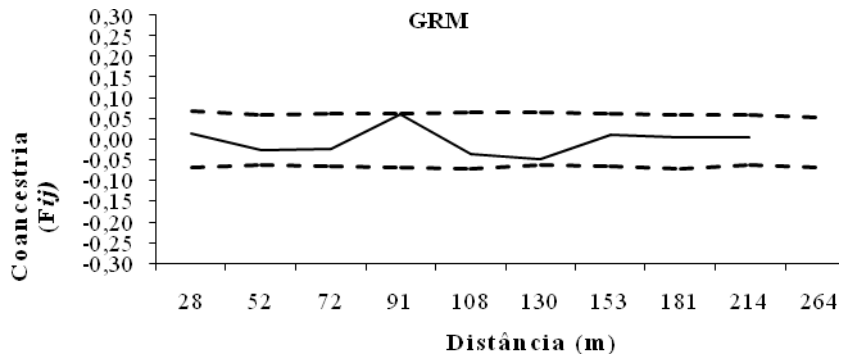
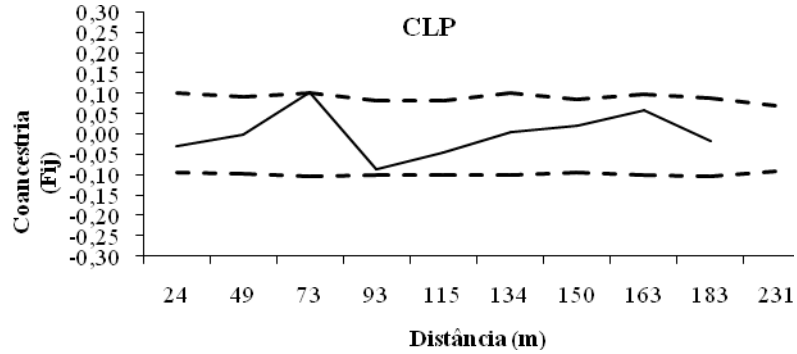
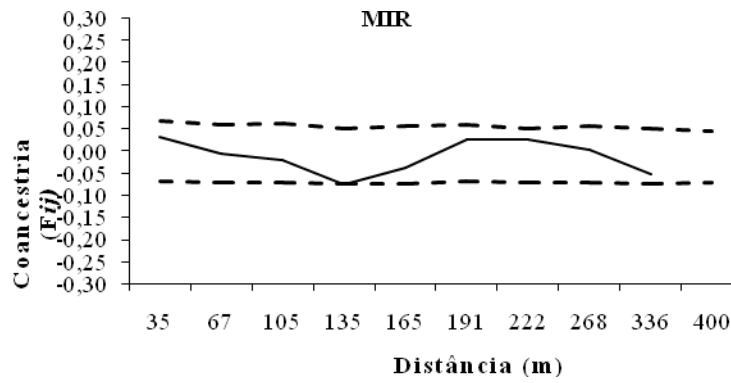
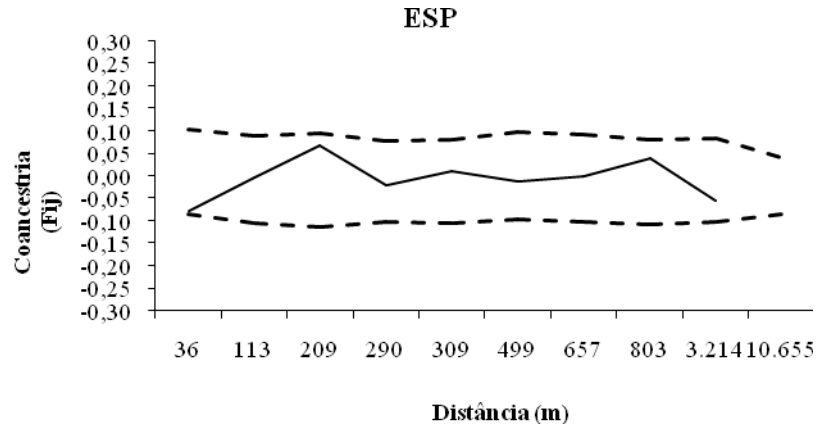
Figura 6: Representação da atribuição dos genótipos para cada população. As cores (vermelho, amarelo, azul, verde e rosa) representam cada atribuição, assumindo 5 populações. 1=ESP, 2=MIR, 3=CLP, 4=GRM, 5=ITA.

Tabela 8: Matriz de distância geográfica entre as populações de *A. aculeata*, em quilômetros

	ESP	MIR	CLP	GRM	ITA
ESP	-				
MIR	207	-			
CLP	266	73	-		
GRM	175	142	150	-	
ITA	231	127	105	65	-

Estrutura genética espacial (EGE)

Os correlogramas das populações de *A. aculeata* estudadas mostram uma distribuição aleatória dos genótipos, com ausência de estruturação genética significativa nas populações de ESP, MIR, CLP e GRM e presença de estruturação genética significativa para a população de ITA (Figura 7; Tabela 9; $p > 0,05$).



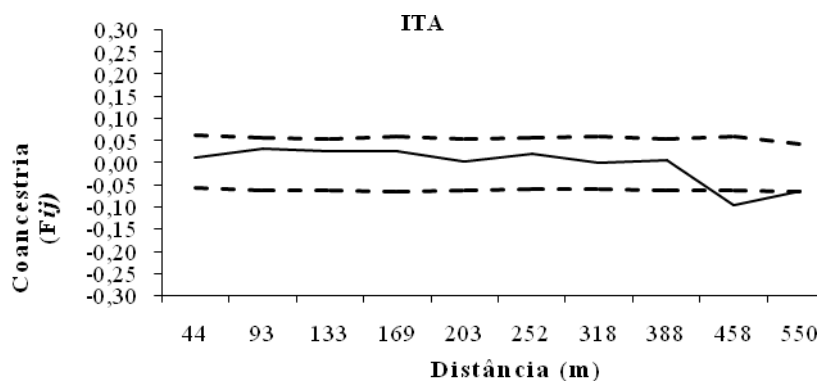


Figura 7: Correlogramas do coeficiente de coancestria (*kinship*), por classes de distância, para indivíduos de *A. aculeata* nas populações naturais amostradas no estado de Minas Gerais ---- intervalo de confiança, a 95% de probabilidade.

Tabela 9: Caracterização da estrutura espacial de *A. aculeata* nas cinco populações, incluindo para cada população o coeficiente de *kinship* (F_{ij}) para primeira classe de distância, os valores da curva de regressão do coeficiente de coancestria B_{log} , estatística S_p e valor de significância (P)

POPULAÇÕES	F_{ij}	B_{log}	S_p	p
ESP	0,013	-0,034605	0,035061	0,027
MIR	-0,07	0,0047791	-0,00444	0,48
CLP	-0,02872	-0,006583	0,006399	0,61
GRM	0,014226	0,0033435	-0,00339	0,93
ITA	0,033026	-0,007114	0,007357	0,63
MÉDIA	-0,00894	-0,008036	0,008197	-

4 Discussão

Diversidade e Estrutura genética

Nucci (2007), ao trabalhar com nove populações de *A. aculeata*, encontrou uma média de 3,0 alelos por loco, uma $He = 0,39$. Os quatro locos microssatélites utilizados no presente trabalho detectaram níveis maiores de multialelismo e diversidade genética de 0,53. Porém, estes valores são menores do que o encontrado em estudos com outras palmeiras com utilização do mesmo tipo de marcador molecular, como Gaioto *et al*

(2001), que encontraram para *Euterpe edulis* $He = 0,86$ em populações próxima ao Distrito Federal. Moreira *et al* (2009), ao trabalhar com *Tabebuia ochracea* encontrou $He = 0,43$. Barbosa *et al.* (2010), verificou que o He da espécie *Palicourea coriacea* (Rubiaceae), uma espécie de ocorrência no Cerrado, foi de 0,296 e consideraram que a espécie apresentou um nível alto de diversidade genética. Os níveis de diversidade genética nas populações foram menores quando comparados com valores reportados para outras espécies: *Hymenaea courbaril* (Lacerda *et al.*, 2008) e *Dipteryx alata* (Tarazi *et al.*, 2010).

O *A. acuelata* possui inflorescências agrupadas em cachos pendentes com até 80 cm de comprimento, pequenas e ambos os sexos estão presentes na mesma inflorescência sendo que as flores masculinas nascem no topo da inflorescência, enquanto as femininas situam-se na base. Essas inflorescências são andróginas com marcada protoginia, o que pode representar uma estratégia para evitar a autofecundação. De acordo com Barrett e Harder (1996) a polinização é fundamental entre as complexas interações ecológicas que geram padrões de cruzamento em plantas, pois determina oportunidades de cruzamento. O tipo de polinização pode limitar o movimento do pólen, interferindo assim na distribuição genética entre e dentro das populações. A polinização principal da macaúba é realizada por coleópteros e o vento desempenhando um papel secundário. Na ausência do agente polinizador a gitonogamia responderá por uma significativa porcentagem na produção dos frutos.

Os altos coeficientes de endogamia encontrados para a maioria das populações analisadas neste trabalho contrastam com a variabilidade genética. É sugerido que possa ocorrer cruzamento entre parentes, decorrente da presença de fatores que limitam a diminuição do fluxo gênico entre as populações (Frankham *et al.*, 2002). O desmatamento de habitats naturais para a criação de pastagens pode reduzir o tamanho

populacional dos dispersores, conseqüentemente reduz-se a chance da polinização acontecer. Isso é bastante plausível, pois em todas as áreas de coleta as populações se encontravam em áreas de pastos. Assim, a limitação na dispersão de pólen pode favorecer a autofecundação dos indivíduos.

Em longo prazo, a endogamia aumenta a freqüência de homozigotos para alelos deletérios permitindo que sejam expressos e assim, diminui a capacidade de adaptação dos indivíduos ao ambiente (Hendrick *et al.*, 1996) mas, provavelmente ainda não resultou em perda acentuada de diversidade genética nas populações estudadas.

No entanto, é importante salientar que estes dados foram obtidos de estimativas históricas, pois os indivíduos estudados são adultos, e provavelmente já se encontravam nos ambientes antes do início do processo de fragmentação do Cerrado. Para obter resultados mais definidos dos efeitos da fragmentação de ambientes na diversidade genética seriam necessários estudos com várias gerações, sendo que estudos com progênies dessas populações podem ser considerados para se acessar a diversidade genética das demais gerações. Conforme James & Ashburner (1997), a prioridade de manejo é alta para minimizar futura redução da diversidade, e o conhecimento dos processos genéticos proporciona a manutenção de habitat apropriado para a reprodução e a sobrevivência de espécies.

Diferenciação genética entre as populações

A análise de estrutura genética das populações de *A. aculeata* mostrou que há uma diferenciação significativa entre as populações estudadas. A estimativa do $\theta=0.32$ foi maior do que a obtida pelo $R_{st}= 0.283$. Segundo Frankham e colaboradores (2002) um valor de diferenciação acima de 0,15 é considerado indicador de significante de

diferenciação entre populações. De acordo Loveless & Hamrick, (1984) se o fluxo alélico for restrito, as populações apresentam uma alta divergência entre si. Os resultados observados aqui, possivelmente são devido ao isolamento pela distância geográfica entre as populações, o que leva à diminuição do fluxo alélico entre as mesmas. Pode também haver impedimentos como barreiras naturais ou antrópicas que dificultam o fluxo alélico entre as populações estudadas fato que pode favorecer o resultado obtido. O fluxo gênico ocorrido no passado entre as populações, pode não ter sido suficiente para tornar as frequências alélicas mais similares entre as mesmas ao longo do tempo.

Pela análise do dendrograma pode-se observar a formação de dois grupos. Esta divisão em dois grupos pode estar associada à localização geográfica dessas populações, já que houve um agrupamento das populações localizadas geograficamente.

O resultado do Teste de Mantel refuta-se a hipótese de isolamento por distância. Collevatti (2001) analisou 10 populações (num total de 314 indivíduos) naturais de *C. brasiliense*, por meio de microssatélites, encontrando correlação positiva e significativa ($r = 0,518$; $P = 0,0396$) entre distância genética e distância geográfica. Entretanto, os autores amostraram populações naturais ao longo de toda a distribuição geográfica da espécie.

Estes resultados, bem como o resultado da análise Bayesiana, mostram que não existe uma estruturação genética entre essas populações. O resultado indicou que as cinco localidades de amostragem analisadas para este programa são de fato reconhecidas como cinco populações distintas e apenas um pequeno número de indivíduos de Grão Mogol e Itacambira compartilham uma maior quantidade de alelos.

Dessa forma, o padrão atual de estruturação genética das populações de *A. aculeata* parece estar relacionado a fatores históricos. Eventos de extinção e

recolonização, *bottleneck* e efeito fundador podem deixar sinais genéticos nas gerações posteriores (Hewitt, 1996; Schaal *et al.*, 1998; Dutech *et al.*, 2003). O fluxo gênico ocorrido no passado entre as populações, pode não ter sido suficiente para tornar as frequências alélicas mais similares entre as mesmas ao longo do tempo. Padrões similares à macaúba foram encontradas para *Eugenia dysenterica* (Zucchi *et al.*, 2003), *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al.*, 2001), *Dipteryx alata* (Tarazi *et al.*, 2010).

Estrutura genética espacial (EGE)

A presença de EGE na população, ou seja, quando os indivíduos aparentados se encontram próximos geograficamente, pode significar ocorrência de cruzamentos endogâmicos (Sebbenn, 1997), sendo também, um indicativo de processos microevolutivos, tais como migração, fluxo gênico, deriva genética e seleção (Setsuko; Ishida; Tomaru, *et al.*, 2004). Vekemans e Hardy (2004) demonstraram que a EGE está correlacionada com o sistema de cruzamento, a forma de vida e a densidade populacional. Dessa forma, informações sobre a EGE auxiliam o entendimento dessas forças, que direcionam a dinâmica genética local (Gonçalves *et al.*, 2010) e são essenciais para a continuidade das espécies.

Ausência de estruturação genética significativa nas populações denota uma distribuição aleatória dos genótipos dentro destas populações. Esse padrão observado para as populações pode ser resultado de um fluxo alélico constante entre os indivíduos de cada uma das populações que, segundo Doligez e Joly (1997), é suficiente para impedir a divergência das frequências alélicas locais e evita assim o agrupamento de indivíduos aparentados.

O conhecimento da estruturação genética espacial populacional fornece importantes informações para a definição de estratégias de amostragem para fins de

conservação ou de melhoramento genético. Entretanto, estratégias de conservação não devem ser realizadas com base apenas nos resultados da estruturação genética espacial. A eles devem ser somados o conhecimento dos níveis de diversidade dentro e entre as populações, os quais fornecem uma perspectiva histórica das mudanças evolutivas que caracterizam uma espécie, permitindo previsões sobre como as populações se comportarão quando sujeitadas a futuros eventos de origem natural e artificial (Wallace, 2002). Assim, como a maioria da diversidade genética distribui-se dentro das populações, a conservação *in situ* de cinco populações estrategicamente escolhidas pode conservar 99% de sua diversidade genética total (Hamrick, 1993) e, para a coleta de sementes para à conservação *ex situ*, a estratégia mais adequada consiste na seleção de um pequeno número de populações e no aumento da quantidade de indivíduos amostrados por população.

5 Conclusões

As populações estudadas apresentaram níveis consideráveis de diversidade genética que se mostrou distribuída majoritariamente dentro das populações. O que evidencia o potencial destas para a conservação genética da espécie. A alta diferenciação genética entre as populações pode ser explicada pela ausência de fluxo alélico detectado entre elas. Foi observado uma ausência de estruturação genética dentro das populações, esse resultado sugere haver uma distribuição aleatória dos genótipos dentro das populações, ou seja, as árvores localizadas espacialmente próximas não apresentam grau de parentesco entre si. Porém, estas populações de *A. aculeata* se encontram em ambientes de pastagens, conseqüentemente os níveis de diferenciação genética entre essas populações pode aumentar nas próximas gerações, tornado assim, essencial a realização de estudos nas progênies dessas populações, para deste modo, então, avaliar os impactos genéticos causados pela fragmentação e o extrativismo nesta espécie.

6 Referências

- Barbosa, T. C. S. et al. Genetic characterization of natural populations of the medicinal plant *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) with molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 695-704, 2010.
- Barrett, S.C.H.; Harder, L.D. Ecology and evolution of plant mating. *Tree*, v.II, n.2, p.73-79, 1996.
- Brown, A.H.D. Isozymes plant populations genetics structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.*, v. 52, p. 145-157, 1978.
- Cipriano, R. Descobrimo o poder da macaúba. http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/folder.2006/foldernoticia.2006-04-03.3722359657/noticia.2006-04-26.0919750710/mostra_noticia, (15 setembro 2011).
- Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, v.10, p.349-356, 2001.
- Dias, L. A. S.; Kageyama, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. *Agrotrópica*, Itabuna, v. 3, n.3, p.119-127, set. 1991.
- Doligez, A.; Joly, H.I. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. *Heredity*, Sheffield, v. 79, v. 1, p. 72-82, jul. 1997.
- Dutech, C.; Maggia, L.; Tardy, C.; Joly, H.I.; Jarne, P. 2003. Tracking a genetic signal of extinction-recolonization events in a neotropical tree species: *Vouacapoua Americana* Aublet in French Guiana. *Evolution*, 57(12): 2753-2764.
- Faleiro, F. G. et al. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. *Agrotrópica*, v.14, n.2, p.31-34. 2003.

Falush, D; Stephens M; Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, Austin, v. 164, p. 1567–1587, ago. 2003.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. *Conservation Genetics*. Cambridge University Press: Cambridge UK, 2002. 617p.

Good, M.J.W; Walker, J. Hamrick, J.L. Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. *Conserv. Biol.* V.10, 1996, p.796-805.

Goodman, S.J. RST Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology*, v.6, p.881-885, 1997.

Goudet, J.; Raymond, M; de-Meeus, T; Rousset, F. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, v.144, p.1933-1940, 1996.

Goudet. J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>, 2002

Hamrick, J.L. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. *In: Differentiation Patterns in higher plants*. Ed. K. Urbanska, p.53-76. Academic Press, New York, Academic Press.

Hamrick, J.L. 1993. Genetic diversity and conservation in tropical forests. *In: Drysdale, R.M.; John, S.E.T.; Yapa, A.C. 1994. Proceedings: International Symposium on Genetic Conservation and Production of Tropical Forest Tree Seed*. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre Project, Muak-Lek, Saraburi, Thailand. p. 1-9.

Hardy, O.J.; Vekemans, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, v.2, p.618-620, 2002.

Hartl, D.L.; Clark, A.G. Principles of population genetics. 3. Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland. 1997.

Hattemer, H.H. Measuring genetic variation. *In*: MÜLLER-STARCK; ZIEHE, M. (Ed.). Genetic variation in European populations of forest trees. Frankfurt am Main: Sauerländer s Verlag. 1991. p. 2-19.

Hedrick, P.W. Genetics of populations. 2. Ed. Jones and Bartlett Publishers Inc. 2000.

Hedrick, P.W., R.C. Lacy, F.W. Allendorf, and ME. Soulé. 1996. Directions in conservation biology: comments on Caughley. *Conserv. Biol.* 5: 1312-1320.

Henderson, A.; Galeano, G.; Bernal, R. Palms of the Americas. Princeton: Princeton University Press, 1995. 352 p.

Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247- 276.

James, E.A.; Ashburner, G.R. Intraspecific variation in *Astelia australiana* (Liliaceae) and implications for the conservation of this australian species. *Biological Conservation*, v. 82, p.253-261, 1997.

Kageyama, P. Y. Conservação 'in situ' de recursos genéticos de plantas. IPEF, Piracicaba, n. 35, p. 7-37, abr. 1987.

Lacerda, A.E.B.; Kanashiro , M.; Sebbenn, A.M. Effects of Reduced Impact Logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. *Forest Ecology and Management*, v.255, p.1034–1043, 2008.

Lewis, P.O.; Zaykin, D. Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data, version 1.0. Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>, 2001.

Loveless, M.D.; Hamrick, J.R. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant mutation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 65-95.

Markley, K.S. Mobocayá or Paraguai coco palm: an important source of oil. *Economic Botany*, New York, v.10, n.1, p. 3-32, 1956.

Moreira, P.A; Fernandes, G.W.; Rosane G. Collevatti, R.G. Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. *Forest Ecology and Management*, v.258, p.2690 - 2695, 2009.

Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, Madison, v. 89, n. 3, p. 586-590, 1978.

Nucci, S.M.; Azevedo-Filho, A.; Colombo, C. A.; Priolli, R. H. G.; Coelho, R. M.; Mata, T.L.; Zucchi, M. I. Development and characterization of microsatellites markers from the macaw. *Molecular Ecology*, v.8, p. 224-226, 2007.

Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* v.6, p.288-295, 2006.

Pott, A.; Pott, V.J. *Plantas do Pantanal*. Corumbá: Embrapa Pantanal,1994. 320p.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945-959.

Rajora, O.P.; Pluhar, S.A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 106, p. 1203-1212, 2003.

Rohlf, F. J. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 2.11. New York: Applied Biostatistics, 2000.

Santos, R. M.; Vieira, F. A. Análise estrutural do componente arbóreo de três áreas de Cerrado em diferentes estádios de conservação no Município de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. *Cerne*, Lavras, v. 11, n. 4, p. 399-408, out-dez. 2005.

Scariot, A. Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. *Principes*, Brasília, v.42, n.1, p.5-8, 1998.

Scariot, A.; Lleras, E.; Hay, J.D. Flowering and fruiting phonologies of the palm. *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. *Biotropica*, Washington, v.27, n.2, p.168-173,1995).

Schaal, B.A.; Hayworth, D.A.; Olsen, K.M.; Rauscher, J.T.; Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7:465-474.

SEBBENN, A. M. Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiáceas) a partir de isoenzimas. 1997. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 1997.

Setsuko, S.; Ishida, K.; Tomaru, N. Size distribution and genetic structure in relation to clonal growth within a population of *Magnolia tomentosa* Thunb. (Magnoliaceae). *Molecular Ecology*, Oxford, v.13, n.9, p.2645-2653, Sept. 2004.

Slatkin, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v. 130, p.457-462, 1995.

Slatkin, M. Gene flow and population structure. In: *Ecological Genetics* (Real, L.a., ed.). Princeton University Press. 1994 Pp. 2-17.

Sun, M. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. bongkongensis*. *Conservation Biology* v 10: 1996 785-795p.

Tarazi, R.; Moreno, M.A.; Gandara, F.B.; Elza Martins Ferraz, E. M.; Moraes, M.L.T.; Vinson, C.C.; Ciampi, A.Y.; Vencovsky, R.; Kageyama, P.Y. High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian cerrado fruit tree *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae), *Genetics and Molecular Biology*, v.33, n.1, p.78-85, 2010.

Vekemans, X.; Hardy, O.J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, v.13, p.921-935, 2004.

WALLACE, L.E. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biology*, v.17, p.37-49, 2002.

Weir, B.S.; Cockerham, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v.38, p.1358-1370, 1984.

Young, A.; Boyle, T.; Brown, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* v.11 1996 p.413-418.

Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Brondani C, Vencovsky R (2002) Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Mol Ecol Notes* 2:512-513.

Zucchi, M.I., Brondani, R.P.V.; Pinheiro, J.B.; Chaves, L.J.; Coelho, A.S.G.; Vencovsky, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.26, n.4, p.449-457, 2003.