

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Patricia Sanae Sujii

“Diversidade e estrutura genética de *Bertholletia excelsa*, uma espécie amazônica de ampla distribuição”

este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Patricia Sanae Sujii
aprovada pela Comissão Julgadora.
Solferini

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre
em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética
Vegetal e Melhoramento.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini
Co-Orientadora: Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo

Campinas, março de 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Su42d

Sujii, Patricia Sanae

Diversidade e estrutura genética de *Bertholletia excelsa*, uma espécie amazônica de ampla distribuição / Patricia Sanae Sujii. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadoras: Vera Nisaka Solferini, Vânia Cristina Rennó Azevedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Castanha-do-pará. 2. Genética de populações. 3. Microsatélites (Genética). 4. Genética vegetal. 5. Floresta amazônica. I. Solferini, Vera Nisaka. II. Azevedo, Vânia Cristina Rennó. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Genetic diversity and structure of *Bertholletia excelsa*, an Amazonian species of wide distribution.

Palavras-chave em inglês: Brazil nut; Population genetics; Microsatellites (Genetics); Plant genetics; Amazon forest.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Vera Nisaka Solferini, Evandro Marsola de Moraes, Alexandre Siqueira Guedes Coelho.

Data da defesa: 02/03/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

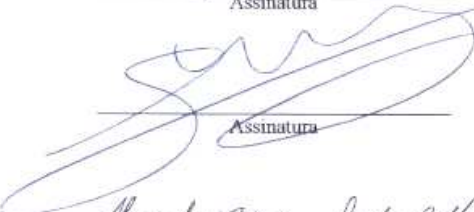
Campinas, 02 de março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Vera Nisaka Solferini


Assinatura

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes


Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho


Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Assinatura

Prof. Dr. Flávio Bertin Gandara

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha mãe Lúcia Yoko Inoue Sujii, ao meu pai Edison Ryoiti Sujii e à minha irmã Cristina Akie Sujii por todo apoio e carinho, por serem a base para todas as minhas conquistas e um dos maiores orgulhos da minha vida. Também às minhas bachans e jichans, tios, primos (de sangue ou adotados), que independentemente de onde estão me fizeram sentir que tenho muita sorte por fazer parte dessa família. Ao meu namorado, Henrique Okajima Nakamoto, pela ajuda na escrita da dissertação e por tudo o que vivemos juntos.

* ** *** ** *

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Unicamp, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida durante o curso de mestrado (2009/03485-0) e pelo financiamento do projeto (2009/50739-7). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. À Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) e à Natura pelo apoio ao projeto, suporte financeiro, técnico e administrativo.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial ao Laboratório de Genética Vegetal, pela oportunidade de executar a parte laboratorial do projeto em suas instalações.

Às unidades da Embrapa, Acre e Roraima, e ao Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas (IDAM) pelo apoio nas viagens de coleta e pelo material enviado para o desenvolvimento do projeto.

À Dra. Vera Nisaka Solferini pela orientação e receptividade e por me ajudar a compreender melhor o que é fazer ciência.

À Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo pela co-orientação, pelo apoio e confiança e pelo incentivo a estudar as árvores amazônicas, desde a iniciação científica.

Aos pesquisadores, alunos e técnicos que colaboraram com o projeto, em especial à Dra. Lúcia Helena de Oliveira Wadt (coordenadora do projeto) e à sua aluna Vanessa Santos Silva, com quem pude aprender muito a respeito das castanheiras, à Francimary Carneiro, Paulo Emilio Kaminski, Hélio Tonini e a todos os demais que colaboraram cedendo amostras para minhas análises.

À Dra. Ana Yamaguishi Ciampi e à Lílían Maria da Silva Lima, ambas pelas árduas coletas no estado do Amapá.

Aos professores que deram suas valiosas sugestões e contribuições ao trabalho Alexandre S. G. Coelho, Evandro M. de Moraes, Louis Bernard Klaczko, Flávio B. Gandara, Flávio A. M. dos Santos, Fernando R. Martins.

A todos os pesquisadores, funcionários, estagiários e bolsistas do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por sempre se mostrarem receptivos e solícitos em ajudar quando foi preciso, com quem aprendi muito e tive o prazer de compartilhar alegrias e sofrimentos de laboratório, em especial, à Ana Ciampi pelo apoio na viagem para coleta das amostras em Manicoré e por tudo o que aprendi desde antes mesmo de iniciar o curso de Ciências Biológicas.

À técnica Célia Bresil, aos meus colegas e amigos do Laboratório de Diversidade Genética da Unicamp e da turma de pós-graduação em Ecologia que me acolheu, pela ajuda nas análises, discussões de assuntos acadêmicos e nem tão acadêmicos assim e com quem tive o prazer de conviver nesses dois anos de mestrado.

Às pessoas especiais que me ajudaram a encarar a distância da família e os desafios de cada dia, que estiveram por perto, mesmo virtualmente e que eu tenho o imenso prazer e orgulho de chamar de amigos.

Às demais pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho.

Sumário

RESUMO	<u>1</u>
ABSTRACT	<u>2</u>
INTRODUÇÃO GERAL	<u>3</u>
CAPÍTULO 01	<u>11</u>
Introdução	<u>12</u>
Objetivos	<u>13</u>
Material e Métodos	<u>13</u>
Resultados	<u>23</u>
Discussão	<u>25</u>
Conclusão	<u>26</u>
CAPÍTULO 02	<u>27</u>
Introdução	<u>28</u>
Objetivos	<u>30</u>
Material e Métodos	<u>30</u>
Resultados	<u>38</u>
Discussão	<u>49</u>
Conclusão	<u>56</u>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<u>57</u>

Resumo

Matas de terra-firme da Amazônia são formações florestais extensas e podem ser encontradas compondo grandes florestas contínuas. Existem diversos estudos a respeito da estrutura genética populacional de espécies presentes nessas florestas, mas são poucos os trabalhos que buscam compreender a estruturação genética ao longo da Amazônia. A castanheira-do-brasil é uma espécie monotípica, *Bertholletia excelsa*, endêmica de matas de terra-firme e distribuída ao longo de quase toda extensão da Amazônia. Este trabalho teve como objetivo avaliar a estruturação genética de populações de *Bertholletia excelsa* ao longo da Amazônia e verificar se a estruturação é influenciada pela distância que as separa. Foi coletado material de 379 indivíduos, pertencentes a nove subpopulações distribuídas em cinco estados brasileiros. Foram desenvolvidos sete marcadores microssatélites que foram somados a outros quatro anteriormente publicados, para genotipagem das amostras. Análises populacionais intra e interpopulacionais foram realizadas para avaliar a diversidade genética e sua estruturação. As estimativas de distância genética encontradas foram correlacionadas com diferentes fatores para encontrar possíveis causas para estruturação. O número de alelos encontrado em cada subpopulação foi baixo. Os alelos presentes em diferentes subpopulações e suas frequências apresentaram grande variação, em especial quando comparadas subpopulações mais distantes. Foi observado F_{IS} negativo para cinco das subpopulações e não significativamente diferente de zero para as quatro demais, indicando excesso de heterozigotos. A estruturação em micro-escala, quando presente, foi pequena. Os valores encontrados para estimativas de estrutura em macro-escala foram bastante variáveis, sendo observada diferenciação genética muito baixa ($\theta = 0,02$) a muito alta ($\theta = 0,244$). A estrutura genética encontrada pode ser analisada considerando três escalas: (i) intrapopulacional; (ii) entre subpopulações separadas por distâncias moderadas (<500km); e (iii) entre subpopulações separadas por grandes distâncias. Em todas as escalas, foi encontrada correlação significativa entre a estruturação genética e a distância que separa os pares de indivíduos ou subpopulações, indicando ser esse um fator importante para estruturação, mas com influência também de outros fatores, principalmente em escalas geográficas maiores.

Abstract

Amazonian upland forests are wide formations and can compose large continuous forests. There are several studies about population genetic structure of species in this kind of forest, but there are few studies that aim to understand the genetic structure along the Amazon. Brazil-nut tree is a monotypic species, *Bertholletia excelsa*, endemic to upland forests and distributed along almost the entire expanse of the Amazon. This study aimed to evaluate genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations over Amazon and verify if the structuring is influenced by distance between them. Material from 379 individuals was collected in nine subpopulations distributed in five states. Seven microsatellites markers were developed to the species and were used with four others, previously published, to samples genotyping. Analyses within and among populations were performed to evaluate genetic diversity and population structure. Genetic distance estimates were correlated to different potential factors to find possible causes to genetic structure. A few alleles were found in each subpopulation and considerable variation was observed in alleles found in each subpopulation and in their allele frequencies, especially when compared very distant subpopulations. Heterozygote excess was observed in five subpopulations while in the other four subpopulations non-significantly different from zero estimates of F_{IS} were found. Fine-scale structure, when present, was small. Estimates to inter population genetic structure varied from low ($\theta = 0,02$) to high ($\theta = 0,244$) values. *B. excelsa* genetic structure can be analysed considering three different scales: (i) within population; (ii) among moderately distant populations (<500km); and among very distant subpopulations. At all scales, significant correlations were found between genetic structure and geographic distance between pairs of individuals or populations. It may indicate that distance is an important factor to this population's genetic structure, but probably there are other factors acting together, especially at great geographical scales.

Introdução geral

A Amazônia estende-se do oceano Atlântico até as encostas orientais da Cordilheira dos Andes, onde predomina o clima equatorial. Está presente em uma área bastante irrigada, cortada pelos rios da bacia amazônica. A vegetação é composta por diferentes formações florísticas, das quais formações florestais são as que ocupam maior área. Dentre as formações florestais encontradas na região amazônica, as mais comuns são: (i) matas de terra-firme, que não são atingidas pelas cheias dos rios; (ii) matas de várzea, alagadas nos períodos de cheias anuais; e (iii) matas de igapós, com terrenos baixos e constantemente alagados, que podem estar nas margens de rios, lagos e igarapés ou inseridas nas matas de terra-firme (Sampaio, 1942). Essas formações apresentam grande diversidade, com algumas espécies arbóreas comuns, mas muitas espécies características de alguma das formações (Gama *et al.*, 2004).

As matas de terra firme ocupam uma área estimada de mais de 3 milhões km², são caracterizadas por nunca serem alagadas (Braga, 1979) e têm formação recente, com origem no período terciário a partir da sedimentação da bacia amazônica. Sua vegetação é composta por árvores de grande porte com formação de dossel, sendo a formação com maior riqueza de espécies (Tadaiesky *et al.*, 2008). Entre as muitas representantes das matas de terra firme podem ser citadas: castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), cumaru (*Dipteryx odorata*), maçaranduba (*Manilkara huberi*) e pequiá (*Caryocar villosum*).

O desmatamento na região amazônica é bastante intenso próximo às margens do Rio Amazonas, em algumas partes do Pará e principalmente no chamado “arco do desmatamento”, que corresponde ao sudeste do estado do Maranhão, ao norte do Tocantins, sul do Pará, norte de Mato Grosso, Rondônia, sul do Amazonas e sudeste do estado do Acre (Figura 1). Em outras partes da Amazônia, o desmatamento ocorre, porém, com menor intensidade. Diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas para tentar diminuir o impacto antrópico na floresta e para promover a conservação de áreas contínuas de matas. Entre essas estratégias está a criação de unidades de conservação, que já tem conseguido resultados positivos, visto que a proporção de áreas desmatadas

dentro das unidades de conservação chega a ser 20 vezes menor do que fora dessas áreas (Ferreira *et al.*, 2005).

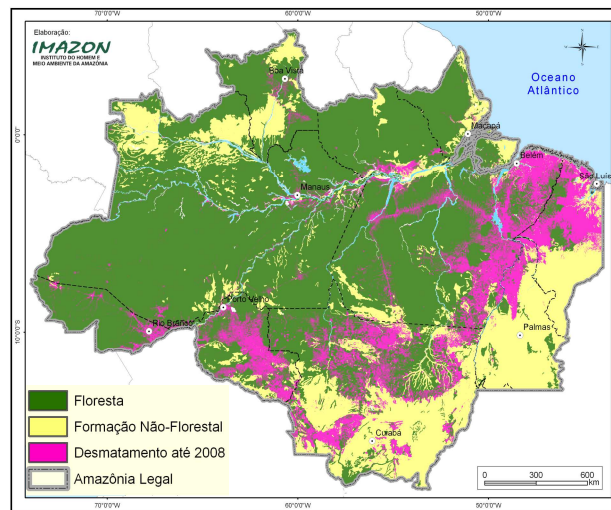


Figura 1. Situação da Amazônia Legal brasileira em 2008. (Fonte: Imazon/SAD)

Unidades de Conservação são áreas legalmente protegidas que podem ter diferentes graus de interferência humana, dependendo da classificação. Essa interferência pode variar desde proteção intensiva, com a possibilidade de acesso apenas para fins científicos, de educação e monitoramento ambiental, até o uso intensivo do habitat com possibilidade de exploração dos recursos naturais, desde que seja sustentável. Em unidades de uso sustentável, como é o caso de Reservas de Desenvolvimento Sustentável, é possível realizar um aproveitamento econômico da floresta por meio de extrativismo de madeira, de frutos, de sementes, de látex, entre outros produtos, desde que seja seguido um plano de manejo. Graças à existência de unidades de conservação, de terras indígenas e da dificuldade de acesso a algumas regiões, ainda é possível encontrar grande áreas de florestas contínuas na Amazônia (Figura 1).

A Amazônia ocupa uma área com pequenas diferenças latitudinais, contrastando com a grande amplitude da área ocupada pela Mata Atlântica. O clima equatorial, predominante na região amazônica, é caracterizado por temperatura e pluviosidade altas durante todo o ano, com pequena variação das médias em diferentes estações. Essas duas características têm como uma das consequências pequena variação ambiental ao longo do

ano. Essa estabilidade climática e relativa homogeneidade ambiental, somadas à alta diversidade genética comumente observada em espécies arbóreas tropicais, poderiam sugerir pequena diferenciação genética entre populações de espécies arbóreas presentes ao longo de sua distribuição geográfica (Alvarez-Buylla *et al.*, 1996; Dayanandan *et al.*, 1999; Veron *et al.*, 2005; Le Guen *et al.*, 2009).

Há evidências históricas e ecológicas, entretanto, que indicam possível diferenciação significativa entre populações distribuídas ao longo de florestas tropicais (Dick & Heuertz, 2008). Essa diferenciação pode ser causada por mecanismos que envolvam seleção natural, com adaptação local, ou deriva genética pelo isolamento das populações. Espécies tropicais podem apresentar maior sensibilidade fisiológica a pequenas mudanças das condições ambientais, quando comparadas a espécies de clima temperado. Tal sensibilidade pode promover variações não apenas latitudinais, mas também longitudinais, dependendo do relevo ou de condições climáticas da região (Janzen, 1967; Ghalambor *et al.*, 2006). Outra evidência que pode ser ressaltada é o fato de ambientes naturais serem formados por um mosaico de fragmentos heterogêneos, mesmo na ausência de interferência humana. Assim, variações naturais do ambiente podem ser responsáveis por criar uma heterogeneidade nas florestas que favorece a diversidade biológica (Meffe; Carrol, 1994).

A conservação da diversidade biológica em seus diversos níveis, desde diversidade de espécies e interações dentro de comunidades até níveis genéticos dentro de uma população, tem grande importância para a preservação de populações viáveis. Eventos estocásticos podem ter efeitos de diferentes magnitudes sobre populações naturais, mas a preservação da diversidade genética inter e intrapopulacional permite a adaptação das espécies a mudanças ambientais (Primack, 1995).

A diversidade genética pode ser quantificada de diversas maneiras. Entre as quais estão: estimativa de diversidade alélica (número médio de alelos por *locus* - A) e da proporção de *loci* polimórficos, que são dependentes do tamanho amostral. Uma terceira estimativa, menos dependente do número de indivíduos amostrados, é a heterozigosidade esperada (H_e), que é a proporção de heterozigotos esperada para uma população que esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Freeland, 2005).

Existe grande discussão a respeito do que define uma “população” e diferentes áreas do conhecimento utilizam diferentes definições e paradigmas, dependendo da pergunta a ser respondida (Waples; Gaggiotti, 2006). A definição adotada aqui será a de Futuyma (1995) que diz que população é um grupo de organismos da mesma espécie que ocupam uma região geográfica mais ou menos definida e que exibem uma continuidade reprodutiva ao longo das gerações.

A compreensão de como está distribuída a diversidade genética ao longo de ambientes pode ser alcançada por meio da análise da estrutura genética populacional. Esta corresponde à distribuição não-aleatória de alelos ou genótipos ao longo da distribuição das populações ou ao longo de gerações. Pode ser causada por adaptação a micro habitats, por seleção diferencial ao longo dos estágios ontogenéticos, por efeitos do acaso ou por características reprodutivas da espécie como reprodução clonal ou dispersão restrita de pólen ou sementes (Hamrick, 1982).

A estruturação existente entre e dentro de subpopulações pode ser quantificada utilizando as estatísticas- F de Wright. A diferenciação entre subpopulações pode ser quantificada por meio da estimativa de F_{ST} , que corresponde à correlação entre genes de diferentes indivíduos de uma subpopulação e genes do total de indivíduos. Essa correlação está diretamente relacionada às variâncias nas frequências alélicas entre subpopulações e ao grau de semelhança dentro de cada subpopulação. Também podem ser estimados desvios das proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg e níveis de endogamia dentro de uma subpopulação pela estimativa de F_{IS} , que é a correlação entre genes dentro de indivíduos dentro de cada subpopulação (Weir; Cockerham 1984; Holsinger; Weir 2009).

A quantificação da diversidade genética, a compreensão da sua distribuição, ou seja, a avaliação da existência de estrutura populacional, juntamente com estudos de fluxo gênico e de sistemas de cruzamento são reconhecidos como importantes ferramentas para a avaliação de efeitos da fragmentação de habitats, para estudos de melhoramento genético e para o desenvolvimento de estratégias de conservação e de manejo de espécies (Erickson *et al.*, 2004; Azevedo, 2007; Vandergast *et al.*, 2007).

Dados de diversidade genética e de estrutura genética populacional podem ser gerados com uso de marcadores moleculares, segmentos de DNA específicos ou fenótipos moleculares resultantes da expressão gênica. Tais marcadores têm grande utilidade para estudos genéticos populacionais, especialmente aqueles capazes de gerar grande quantidade informação rapidamente. A escolha do tipo de marcador a ser utilizado depende da pergunta a ser respondida. A aplicação de marcadores moleculares em estudos de conservação tem crescido com o desenvolvimento de novas tecnologias mais precisas e de menor custo. Além disso, com o avanço de análises mais sofisticadas, estudos de populações naturais têm passado de simples descrições de variabilidade e diferenciação genética para inferências a respeito do passado demográfico do grupo.

Esse tipo de análise requer informações como distribuição alélica, endogamia e diferenciação populacional. Essa necessidade de informações da história recente do grupo somada à escassez de informações para espécies “não-modelo”, como é o caso da maioria das árvores de florestas tropicais, fazem dos marcadores microssatélites uma ferramenta de grande utilidade (Schlötterer, 2004).

Marcadores microssatélites são sequências simples, de uma a seis bases, repetidas em tandem (*SSR – Simple Sequence Repeats*), co-dominantes, multialélicas, com alto grau de polimorfismo, encontradas em alta frequência e bem distribuídas ao longo do genoma de plantas superiores (Tóth *et al.*, 2000). Essas características favorecem sua utilização em estudos de paternidade, mapeamento e genética de populações. Entre as vantagens em relação a outros tipos de marcadores para tais estudos podem ser citadas alta reprodutibilidade e simplicidade técnica, pequena quantidade de DNA requerida, grande poder de resolução e alto polimorfismo. As maiores desvantagens do uso desse tipo de marcador são tempo e custo relativamente elevados para o desenvolvimento dos *primers*, por tratar-se de um marcador específico. Entretanto, essa desvantagem vem sendo superada com o desenvolvimento de técnicas de construção de bibliotecas genômicas enriquecidas, que tornam o processo mais rápido e fácil. Além disso, *primers* para microssatélites, uma vez desenvolvidos por um laboratório, podem ser rapidamente sintetizados e utilizados por outros grupos e muitas vezes são conservados em diferentes

espécies, podendo ser transferidos para espécies próximas (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Borém; Caixeta, 2006).

A compreensão de como está distribuída a diversidade genética em um ambiente amplo como a Amazônia pode ser alcançada utilizando populações de espécies com distribuição ao longo de toda floresta e que sejam menos sensíveis a pequenas mudanças recentes no ambiente como modelo. Algumas espécies arbóreas de vida longa encontradas nas matas de terra firme preenchem esses requisitos, entre as quais está a castanheira-do-brasil.

Castanheira-do-brasil ou Brazil nut tree (Figura 2), como é conhecida a *Bertholletia excelsa* Humb.; Bonpl. (Lecythidaceae), é a única espécie do gênero. É uma árvore de grande porte que pode alcançar 50m de altura e, de acordo com estimativas realizadas utilizando datação com carbono, mil anos de idade, com mais de cinco metros de diâmetro à altura do peito (DAP) e com 20 a 35m de diâmetro de copa (Camargo *et al.* 2004; Haugaasen, et al. 2010). É uma espécie endêmica da região amazônica e pode ser encontrada em áreas de mata de terra firme de toda a região, com densidades que variam de 0,005 a 23 árvores/ha, sendo observadas até 5 árvores/ha na maior parte dos levantamentos. Em geral, crescem em agrupamentos conhecidos como castanhais e dependem de aberturas no dossel para crescimento das plântulas (Moritz, 1984; Müller *et al.*, 1980; Mori; Prance, 1990; Maués, 2002; Peres *et al.*, 2003; Salomão, 2009). As árvores adultas (reprodutivas) apresentam distribuição aleatória dentro dos castanhais, diferentemente dos jovens (não-reprodutivos) comumente agrupados ao redor dos adultos (Wadt *et al.*, 2005).

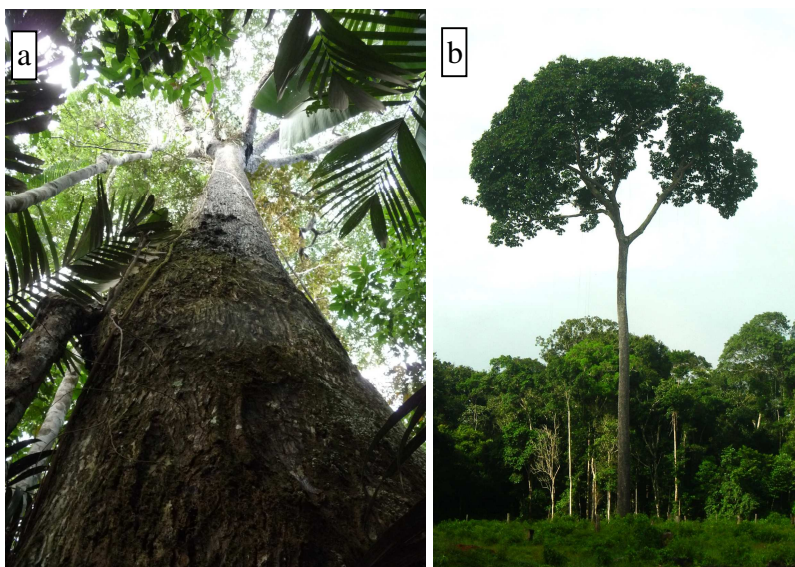


Figura 2. *Bertholletia excelsa*: a) mata preservada; b) área aberta.

A floração geralmente ocorre nos meses com baixa pluviosidade, de setembro a dezembro no Pará, e de setembro a janeiro em Rondônia, com pelo menos 90% das árvores adultas floridas em novembro e dezembro em ambos (Maués, 2002; Vieira *et al.*, 2007). As flores dessa espécie monóica são hermafroditas e apresentam características na morfologia floral que permitem que a polinização seja realizada apenas por abelhas de médio e grande porte. Essas abelhas são as que apresentam tamanho e força suficientes para empurrar o capuz presente sobre os estames e alcançar o pólen dentro da flor (Mori, 1988). Os principais agentes polinizadores são abelhas carpinteiras e mamangavas (Apidae e Anthophoridae) capazes de voar por longas distâncias (mais de 20 km) e que normalmente visitam mais de uma vez as mesmas plantas ao longo da sua rota de alimentação (Janzen, 1971; Maués 2002). Esse tipo de síndrome de polinização, associado ao seu sistema de auto-incompatibilidade já observado em estudos anteriores, evidencia a grande importância dos polinizadores para a produção de frutos pela espécie (Cavalcante, 2008).

Os frutos (Figura 3a) apresentam desenvolvimento lento, que leva em média 14 meses e as sementes mantêm-se dentro do fruto mesmo após seu amadurecimento e queda (Maués, 2002). A dispersão é feita principalmente por cotias (*Dazypsecta sp.*) que utilizam as castanhas como alimento e enterram-nas em média entre cinco e 10m de distância do ponto de coleta (Figura 3b). Também pode ocorrer, ocasionalmente,

dispersão a distâncias maiores realizada por macacos cairara, macacos prego ou araras vermelhas ou em eventos de dispersão secundária por cotias podendo alcançar até 100m a partir do ponto de queda do fruto (Shanley; Medina, 2005; Haugaasen *et al.*, 2010).



Figura 3. Fotografias de frutos observados no mesmo dia: a) em desenvolvimento, ainda preso à árvore; b) resultado do ano anterior, aberto por cotia.

A castanheira é uma espécie de grande importância no extrativismo na região amazônica (IBGE/SIDRA, 2010), sendo uma das principais fontes de renda florestal do Acre e do Amapá. Devido à sua grande importância para as comunidades locais, que dependem da coleta das sementes para seu sustento, seu corte é proibido por lei (Instrução Normativa IBDF nº 001/80, segundo Código Florestal – Lei Federal nº 4771). Assim, é possível observar castanheiras isoladas em áreas abertas (Figura 2b). Além disso, a espécie é classificada como vulnerável (A1acd+2cd) na *Red List of Threatened Species* (IUCN, 2010), com a principal ameaça sendo atribuída à perda de habitat por desflorestamento. Também foi observada escassez de plantas jovens (DAP < 60 cm) em diversos locais ao longo da Amazônia, principalmente em áreas em que é realizado extrativismo das sementes (Peres *et al.*, 2003).

Estudos genéticos de diversidade e de sistemas de cruzamento de *B. excelsa* já foram realizados utilizando marcadores RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e isoenzimas (Kanashiro *et al.*, 1997; O'Malley, 1998; Serra, 2006). Entretanto, ainda não existem estudos mais aprofundados sobre a espécie, com marcadores codominantes, nem estudos de genética que abranjam de forma mais ampla sua distribuição.

Capítulo 01

Desenvolvimento e Otimização de Marcadores Microsatélites de Castanha-do- Brasil (*Bertholletia excelsa*)

1.1 Introdução

Castanheira-do-brasil ou castanheira-da-Amazônia, como é conhecida a *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Lecythidaceae), é uma espécie arbórea que pode alcançar 50m de altura, mais de cinco metros de diâmetro e mais de mil anos de idade, de acordo com estimativas realizadas utilizando datação com carbono (Camargo *et al.*, 2004). É endêmica de Florestas Ombrófilas da Amazônia, encontrada em áreas de terra firme (Müller *et al.*, 1980; Moritz, 1984; Mori & Prance, 1990; Maués, 2002). Suas sementes têm grande importância econômica no extrativismo na região amazônica (IBGE/SIDRA, 2006). Além disso, a espécie é classificada como vulnerável (A1acd+2cd) na *Red List of Threatened Species* (IUCN, 2010), com a principal ameaça sendo atribuída à perda de habitat por desflorestamento.

Estudos genéticos de diversidade e de sistemas de cruzamento de *B. excelsa* já foram realizados utilizando marcadores RAPD (Kanashiro *et al.*, 1997; Serra, 2006) e isoenzimas (O'Malley, 1998). Entretanto, ainda é pequena a quantidade de estudos que envolvam a estruturação genética da espécie. A quantificação e compreensão de como está organizada a diversidade genética populacional, somada a estudos de fluxo gênico e de sistemas de cruzamento vem sendo reconhecidos como importantes ferramentas para o desenvolvimento de estratégias de conservação e de manejo de espécies. Tais informações também podem auxiliar na identificação de efeitos da fragmentação de habitats (Azevedo 2007; Erickson *et al.* 2004; Vandergast *et al.* 2007).

A utilização da genética para conservação de populações naturais requer informações a respeito de distribuições alélicas, endogamia, diferenciação populacional, entre outros. Essa necessidade de informações da história recente do grupo somada à escassez de informações para espécies “não-modelo”, como é o caso da maioria das árvores de florestas tropicais, fazem dos marcadores microssatélites uma ferramenta de grande utilidade (Schlötterer 2004). Marcadores microssatélites são sequências simples, de uma a seis bases, repetidas em tandem (*SSR – Simple Sequence Repeats*). São marcadores co-dominantes, multialélicos, com alto grau de polimorfismo, encontrados em alta frequência e bem distribuídos ao longo do genoma de plantas superiores (Tóth *et al.*, 2000), sendo bastante utilizados em estudos de paternidade, mapeamento e genética de populações.

A principal limitação do uso de marcadores microssatélites é o alto investimento de tempo e dinheiro necessários para o desenvolvimento dos *primers*. Um método que pode tornar o processo mais rápido é a construção de uma biblioteca genômica enriquecida, que consiste em isolar um conjunto de pequenos fragmentos de DNA, dos quais aproximadamente 50% contêm sequências de repetições microssatélites. Esse método permite obter uma grande quantidade de marcadores a partir de uma quantidade muito menor de colônias do que o obtido com outras técnicas (Ostrander *et al.*, 1992).

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver marcadores microssatélites para a espécie *Bertholletia excelsa*, que serão utilizados em estudos de genética de populações para fornecer informações a respeito da diversidade genética e da estrutura genética espacial da espécie.

1.2.2 Objetivos específicos

- Encontrar sequências de microssatélites dinucleotídeos (AG) de *B. excelsa* e desenhar *primers* para as regiões flangeadoras dos microssatélites;
- Encontrar as condições para amplificação de fragmentos de DNA para cada par de *primers*.
- Encontrar *loci* polimórficos para os estudos populacionais e validar os *primers* fazendo estimativas de diversidade genética para um conjunto de amostras.

1.3 Material e Métodos

1.3.1 Extração de DNA

DNA genômico foi extraído a partir de tecido foliar e dos discos de câmbio por meio do procedimento de CTAB 2% (Doyle; Doyle, 1987) adaptado por Machado *et al.* (2002), no qual a trituração do material é realizada com o equipamento Fastprep – BIO 101 SAVANT, sem nitrogênio líquido. O desenvolvimento de marcadores SSR requer quantidade mínima de 50µg de DNA de boa qualidade (Buso *et al.*, 2003).

1.3.2 Áreas de coleta

A. Colônia São João, Seringal Petrolina (220 ha): área de propriedade particular localizada no Município de Senador Guimard, sudoeste do estado do Acre.

B. Reserva Extrativista Chico Mendes – Resex Chico Mendes (970.570 ha): unidade de conservação (UC) federal de uso sustentável, localizada no sudoeste do estado do Acre, nos municípios de Assis Brasil, Brasiléia, Xapuri, Capixaba, Senador Guimard, Rio Branco e Sena Madureira.

C. Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru – RDS do Rio Iratapuru (806.000 ha): UC estadual de uso sustentável, localizada no sul do estado do Amapá, nos Municípios de Laranjal do Jarí, Mazagão e Amapari.

Em cada local (Tabela 1), foi coletado material de árvores adultas. Na Colônia São João (AC), folhas de apenas uma árvore foram coletadas e congeladas logo em seguida. Na Resex Chico Mendes (AC) e na RDS do Rio Iratapuru (AP), discos de câmbio vascular com aproximadamente 2,0cm de diâmetro e 1,0mm de espessura foram coletados (Figura 1). Os discos de câmbio foram conservados em microtubos contendo 1ml de tampão de transporte (300µl de tampão CTAB 2%; 700µl de etanol absoluto) mantido entre 4°C e 10°C.

Tabela 1. Locais de coleta com seus respectivos números de indivíduos amostrados (*N*) e finalidades de cada coleta.

Local	<i>N</i>	Finalidade	Coordenadas
Colônia São João (AC)	1	Desenvolvimento de <i>primers</i>	10°2'S 67°39'W
Resex Chico Mendes (AC)	6	Teste de polimorfismo	10°49'S 68°23'W
RDS do Rio Iratapuru (AP1)	45	Análise populacional	0°16'S 52°31'W



Figura 1. Coleta de disco de câmbio vascular.

1.3.3 Desenvolvimento de *primers*

O desenvolvimento de *primers* que flanqueiam regiões de microssatélites não requer necessariamente a construção de uma biblioteca enriquecida, entretanto, a aplicação dessa metodologia permite obter número maior de marcadores de forma mais eficiente. Portanto, foi utilizado protocolo desenvolvido por Rafalski *et al.* (1996) e adaptado por Buso *et al.* (2003).

A) Digestão do DNA:

O teste de digestão do DNA foi feito utilizando apenas a enzima de corte raro *EcoRI*, tendo como controle a digestão do padrão *Lambda* para verificar a pureza do material extraído. Para identificar qual enzima de restrição geraria a maior quantidade de fragmentos no intervalo de 200 a 800pb, foi feito um teste com as três enzimas para as quais existem adaptadores com sequência de corte. As enzimas utilizadas para digestão foram: *Sau3A* (↓GATC), *MseI* (↓TAA) e *Tsp 509* (↓AATT). A incubação foi feita a 37°C para as duas primeiras e 65°C para a última, todas por 12h, de acordo com indicações do fabricante.

Após a verificação da qualidade do material extraído e da seleção da enzima com o melhor perfil de digestão, foi feita uma reação de digestão com aproximadamente 50µg de DNA e 250U da enzima a 37°C por 12h.

B) Recuperação dos fragmentos

Todo material digerido (240µl), adicionado de 40µl de tampão de corrida de Ficol 15%, foi aplicado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, com marcador de

peso molecular *Ladder* 1kb (Invitrogen) (Figura 2a). A recuperação dos fragmentos de 200 a 800pb foi feita por meio do corte da porção do gel de agarose com as bandas desejadas, eluição e purificação com o kit *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. A quantificação e a verificação do tamanho dos fragmentos do material eluído foram feitas em gel de agarose 2%, utilizando como marcadores de peso molecular λ DNA e *Ladder* 1Kb (Invitrogen) (Figura 2b).

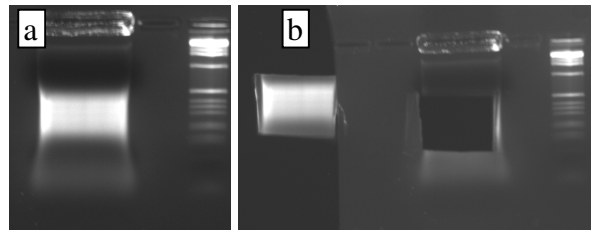


Figura 2. DNA digerido (esquerda) e marcador de peso molecular *Ladder* 1kb(direita). (a) Visualização do resultado da digestão e (b) corte da porção do gel de agarose que continha fragmentos de 200 a 800pb.

C) Ligação de adaptadores

Aproximadamente 5 μ g de DNA dos fragmentos recuperados foram ligados a 200 μ mol de adaptadores do sítio de restrição de MSE I, em reação contendo Tampão da T4 DNA ligase 1x, 25U de T4 DNA ligase, com um volume total de 120 μ l. A solução foi incubada a 4°C por 12h.

D) Ligação de biotina aos oligos TC₁₃

Oligonucleotídeos poli AG/TC foram ligados à biotina, por meio de uma reação contendo 200 pmol de TC₁₃ (100 pmol/ μ l), tampão 1x da terminal transferase, 50 nmol de biotina, 16 dUTP e 26,5 U de terminal transferase. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. A inativação da enzima e a precipitação da reação foram feitas pela adição de EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (2M) e 2,5 volumes de etanol absoluto por 12 horas. O material foi centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos. O *pellet* formado foi lavado em etanol 70% e ressuspendido em 30 μ l de água ultrapura.

E) Hibridização de streptavidina à biotina

Foram lavadas 1000 µg de contas magnéticas (*Dynabeads* – Streptavidin Boehringer Mannheim), a uma concentração de 10µg/µl, com 400 µl de tampão PBS pH 7,4 e 1% BSA. As contas magnéticas foram separadas utilizando um ímã, o que permite a retirada da solução aquosa (sobrenadante) utilizando uma micropipeta. As contas foram lavadas com 400µl de BEW 1x e solução aquosa foi novamente retirada como descrito acima. Após a lavagem, foram adicionados 200µl de BEW 2x, 170µl de água ultrapura e 30µl de Bio-oligos (biotina + oligos TC₁₃). A solução permaneceu sob agitação por uma hora em temperatura ambiente para que houvesse a hibridização da biotina com as contas magnéticas. As contas ligadas aos Bio-oligos foram novamente precipitadas, o sobrenadante retirado e o complexo lavado duas vezes com 400 µl de BEW 1x e uma vez com 400 µl de SSC 5x + SDS 0,1%. Para ressuspender o complexo Bio-oligos-contas, foram adicionados 150 µl de SSC 10x + SDS 0,2% pré-aquecido a 65°C. A solução foi incubada a 65°C por 15 minutos e armazenada a 4°C.

F) Hibridização dos oligos ao DNA

O DNA já ligado ao adaptador foi hibridizado com o complexo descrito acima pela adição de 0,5 volume de água ultrapura seguida de desnaturação a 95°C por 15 minutos.

G) Recuperação dos fragmentos que contém SSR

A fim de retirar excessos de reagentes como contas, biotina e oligos que não formaram complexos, foram preparados seis tubos para as lavagens da solução. No primeiro tubo foi diluído 1µl de DNA ligado ao adaptador em 1000µl de água ultrapura, que foi utilizado como controle. O complexo Bio-oligos-contas foi adicionado ao restante do DNA ligado ao adaptador e este foi incubado a 65°C por 90 minutos para que ocorresse a hibridização dos fragmentos de DNA que continham sequências SSR aos oligos TC₁₃. O complexo foi precipitado com auxílio do ímã e seu tubo foi identificado com o número sete. O sobrenadante foi retirado e colocado no tubo de número dois. O complexo foi lavado duas vezes, por cinco minutos e duas vezes por 15 min com 400µl de SSC 2x + SDS 0,1%. Cada sobrenadante foi retirado e colocado nos tubos numerados

de três a seis. Para ressuspender o complexo, presente no tubo de número sete, foram adicionados 200 µl de água ultrapura.

H) PCR para recuperação da dupla fita

Com o objetivo de avaliar o enriquecimento e de determinar se houve perda de DNA durante o processo, reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram feitas com todos os sete tubos preparados segundo descrito acima. Neste processo foram utilizados 2µl de DNA, tampão PCR 1x (10x, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1µM dos *primers* complementares à sequência dos adaptadores (MSE I), 0,25 mM de dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura estéril para um volume final de 25µl. O programa de amplificação via PCR foi composto por uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 20 ciclos com uma desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos *primers* a 56°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Era esperado que só ocorresse amplificação do material no qual exista DNA, ou seja, no tubo controle que continha apenas DNA e adaptador e no tubo acrescido do complexo Bio-oligos-contas-DNA, identificado com o número sete.

Após a verificação da ocorrência do enriquecimento e da ausência de perda de DNA no processo de lavagem, foi feita uma reação com DNA enriquecido, utilizando as mesmas condições e o mesmo programa do teste, mas com um volume 30 vezes maior.

I) Purificação do produto de PCR

O produto de PCR proveniente da reação utilizando o DNA ligado ao adaptador e acrescido do complexo Bio-oligos-contas-DNA foi purificado utilizando o kit Qiaquick (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

J) Ligação do DNA ao vetor pGEM-T

Os fragmentos contendo sequências hiper-variáveis de SSR foram ligados em plasmídeos pGEM-T Easy (Promega) (Figura 3). Para essa reação foram utilizados 3µl do DNA purificado, tampão T4 DNA ligase 1x, 3U de T4 DNA ligase, 5ng de pGEM-T e água ultrapura. A incubação foi feita a 4°C por 12 horas.

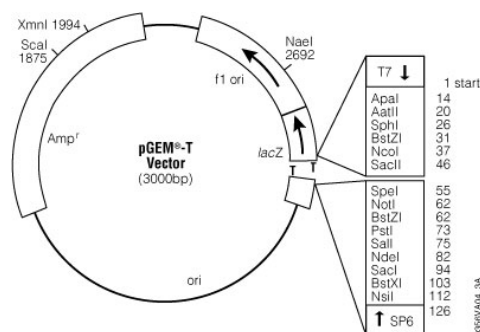


Figura 3. Desenho esquemático do vetor pGEM-T evidenciando a região onde o fragmento é inserido (Fonte: Promega).

K) Transformação em *E. coli*, repicagem e seleção de clones positivos

Para a transformação, foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* cepa XL1-Blue pelo método de eletroporação. Foram utilizados 2µl do produto da reação de ligação com o vetor, 2µl de água ultrapura e 50µl de células competentes armazenadas a -80°C. A eletroporação foi feita a 1,8V e em seguida foram adicionados 950 µl de meio SOC. A solução foi incubada por 1 hora a 37°C sob agitação. As células transformadas foram inoculadas em placas de petri preparadas com 248µl de meio de cultura LB contendo ampicilina (50µg/ml), 32 µl de Xgal (40µg/µl), 16µl de IPTG (0,5 M) e incubadas a 37°C por 14 horas.

A seleção dos clones foi direta, sendo baseada na atividade do gene da β-galactosidase. As colônias brancas (recombinantes) possuem esse gene inativo e não produzem a enzima que cliva o X-gal produzindo o azul de índigo. Os clones não recombinantes possuem esse gene ativo sendo capazes de transcrever e traduzir a enzima, o que torna as colônias azuis. A eficiência de transformação foi calculada por meio da razão entre colônias brancas e o total de colônias obtidas.

Cada colônia branca foi repicada em duas novas placas de PCR com fundo em forma de U (96 colônias/placa) contendo 150µl de meio LB líquido com ampicilina em cada poço. Em seguida ambas as placas foram incubadas a 37°C por 14 horas sob agitação (Sambrook *et al.*, 1989; Rafalski *et al.*, 1996). Foi diluído 1µl do meio de cultura em 80 µl de água ultrapura estéril.

L) PCR de DNA *template*, reação de sequenciamento e purificação

O meio de cultura diluído em água foi utilizado em reações de PCR para a geração de *templates* para as reações de sequenciamento. A geração desses *templates* requer a amplificação de fragmentos de DNA com os *primers forward* e *reverse* M13, complementares às sequências dos vetores.

As reações apresentaram volume final de 10µl, sendo: DNA *template* (2,0µl), tampão 1x (10mM Tris-HCl, pH 8,3; 50mM KCl), MgCl₂ (0,3mM), *primers* M13 *forward* ou *reverse* (1,0µM), dNTP (0,15mM), BSA (0,2mg/ml), Taq DNA polimerase (1U) e água ultrapura estéril. O programa da reação de PRC foi constituído de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando as enzimas Exonuclease I, que degrada *primers* não incorporados, e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*), que desfosforila plasmídeos digeridos com enzimas de restrição, o que previne a religação desse plasmídeo. O produto purificado foi utilizado como *template* nas reações de sequenciamento realizadas com o *Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing*. A reação foi composta por aproximadamente 100ng de DNA *template*, tampão para sequenciamento *BigDye Terminator* 1x, pré-mix - *Big Dye Terminator* (1µl), *primers* M13 *forward* ou *reverse* (0,16µM) e água ultrapura. Foi utilizado como controle o DNA do plasmídeo M13. A reação de sequenciamento foi feita seguindo o programa: 94°C por 2 minutos; 25 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por 4 minutos; seguidos de uma extensão final de 60°C por 5 minutos.

As reações foram purificadas antes de serem sequenciadas utilizando o protocolo de purificação da reação de sequenciamento com precipitação por Etanol/EDTA proposto pelo fabricante (Applied Biosystems – BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit).

M) Desenho de *primers*

As sequências que continham SSR di ou trinucleotídeos foram selecionadas. Foram desenhados *primers* específicos complementares às regiões que flanqueiam as sequências repetitivas utilizando o *software* Primer 3 (Rozen; Skaleshy, 2000). Os *primers* foram desenhados respeitando os seguintes critérios: temperatura média de

anelamento entre 52°C e 58°C; diferença nas temperaturas de anelamento de no máximo 3°C para cada par (*forward* e *reverse*); proporção de 40% a 60% de C e G na sequência do *primer*; e não complementaridade entre *primers* do mesmo par.

Todos os *primers* desenvolvidos foram marcados com um dos seguintes fluorocromos: HEX (verde) ou 6-FAM (azul).

1.3.4 Ajuste das condições de PCR

As condições ótimas de amplificação dos fragmentos foram definidas utilizando DNA de quatro árvores de *B. excelsa* para cada par de *primers* desenvolvidos. As condições de teste foram: DNA (3 a 5ng), tampão PCR 1x (10mM Tris-HCl, pH 8,3; 50mM KCl), *primer forward* e *reverse* (0,2 a 0,3µM), MgCl₂ (1,5mM a 3,0mM), BSA (0,25 a 0,4mg/ml), dNTP (0,25mM) e 0,6 unidades de Taq polimerase (Phoneutria).

O seguinte programa de PCR foi utilizado para amplificação dos fragmentos: desnaturação a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento em teste (50°C a 58°C) por 1 minuto, extensão dos fragmentos a 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. A temperatura de anelamento inicialmente testada foi de 56°C para todos os pares de *primers* e foi variada a fim de obter amplificação mais específica e eficiente dos fragmentos de DNA. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio, utilizando trasluminador de luz UV. As imagens do gel foram registradas com fotodocumentador *Gel Logic 200 Imaging System* (Kodak).

1.3.5 Análise de polimorfismo de loci

Para a detecção de polimorfismo, foi utilizado DNA de 12 indivíduos, sendo seis provenientes do Acre e seis do Amapá, de modo que diferenças genéticas entre amostras de regiões diferentes puderam ser identificadas, mesmo que dentro de cada região não fosse encontrado polimorfismo. A detecção dos polimorfismos das amostras foi feita por meio da separação dos fragmentos com analisador automático ABI 3700 (*Applied Biosystems*) e identificação dos tamanhos dos fragmentos utilizando os *softwares* GeneScan e Genotyper.

O polimorfismo foi detectado por meio da observação direta dos genótipos, com verificação dos de alelos presentes em cada *locus*. Os *primers* que amplificaram *loci* com pelo menos três alelos ou pelo menos um alelo exclusivo das amostras do Acre ou do Amapá (alelos privados), com bandas claramente identificáveis foram considerados com potencial para uso em estudos populacionais. Estes *primers* foram os escolhidos para utilização nas análises populacionais. *Loci* com apenas um ou dois alelos não foram considerados por terem baixo potencial discriminatório.

1.3.6 Validação dos loci

A validação dos *loci* amplificados pelos *primers* escolhidos foi feita por meio da estimativa de diversidade genética das 45 amostras do Amapá. Fragmentos de DNA de cada indivíduo foram amplificados via PCR com cada par de *primers* selecionado seguindo as condições mencionadas anteriormente. A separação dos fragmentos foi realizada com analisador automático ABI 3700 (*Applied Biosystems*). Os tamanhos dos fragmentos gerados com cada par de *primers* para cada indivíduo foram identificados utilizando *softwares* GeneScan e Genotyper.

A diversidade genética foi caracterizada por meio da estimativa das frequências alélicas, do número médio de alelos por *locus* (A), de heterozigosidade observada (H_o) e esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). Também foi estudada a estruturação da diversidade genética por meio das estatísticas- F de Wright, utilizando f como estimador de F_{IS} (Weir; Cockerham, 1984). Os intervalos de confiança (IC_{95%}) para as estimativas dos índices de fixação foram obtidos pelo método de reamostragem sobre os *loci* com 10.000 *bootstraps* com o software GDA 1.0 (Lewis; Zaykin, 2001). Foram feitos testes para detecção de desequilíbrio de ligação (DL) com base em permutações. O *software* FSTAT (Goudet, 1995) foi utilizado para realizar as estimativas e os testes. A verificação da presença de alelos nulos foi realizada utilizando o *software* FreeNA (Chapuis; Estoup, 2007).

1.4 Resultados

1.4.1 Biblioteca genômica enriquecida para sequências hiper-variáveis

A enzima de restrição *MseI* foi a que produziu a melhor digestão do DNA de *B. excelsa*, ou seja, produziu maior quantidade de fragmentos com tamanho no intervalo entre 200 e 800pb, sendo a selecionada para a construção da biblioteca genômica.

Dos 50µg de DNA digerido, foi possível recuperar 10µg por meio de eluição de DNA do gel de agarose. Foram consideradas positivas para hibridização com a sonda poli AG/TC 70% das colônias observadas. Foi feito o sequenciamento de 171 fragmentos amplificados a partir de DNA do inserto.

1.4.2 Otimização dos marcadores SSR

Foram desenhados 16 pares de *primers* complementares às sequências que flaqueiam regiões contendo microssatélites di ou trinucleotídeos. As condições de PCR que permitiram anelamento mais específico dos *primers* e amplificação mais eficiente dos fragmentos para os marcadores desenvolvidos foram: DNA (3 a 5ng), tampão PCR 1x (10mM Tris-HCl, pH 8,3; 50mM KCl), *primer forward* e *reverse* (0,2µM), MgCl₂ (1,5mM), BSA (0,4mg/ml), dNTP (0,25mM) e 0,6 unidades de Taq polimerase (Phoneutria). A temperatura de anelamento para todos os pares de *primers* foi de 56°C.

Dos 16 pares de *primers* desenvolvidos, 10 permitiram a amplificação fragmentos com bandas nítidas e consistentes, observadas em gel de agarose. Desses, sete permitiram amplificação de fragmentos que puderam ser observados em bandas nítidas, ou seja, sem muitos *stutters* (fragmentos resultantes de anelamento inespecífico dos *primers* ou deslizes da enzima Taq DNA polimerase), com pelo menos três alelos ou um alelo privado (Tabela 2).

Tabela 2. *Primers* com potencial para utilização em estudos populacionais e resultados das análises de polimorfismo com 12 indivíduos do Acre e do Amapá.

Locus	Motivos de repetição	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Amplitude alélica (pb)	TA (°C)	A	AP
Bet 01	(AG) ₆	F: TTAACTGATGAAAGGCGGACT R: TACGCAGAACAGACTCGCTAAA	222 - 238	56	3	2
Bet 05	(TC) ₁₄	F: TAATCTCACAACAAATAACG R: CTAGCTTGATCCTAGAGAAA	101 – 107	56	3	1
Bet 06	(TC) ₇	F: CTCTAGGATCAAGCTAGCCCAA R: AGGTTATGCTCCAAATAGCAGG	146 - 150	56	2	1
Bet 12	(TC) ₁₁	F: ATAAGGACCGCCCATCATC R: ATAGCGAGAGCAACCTTTGAAC	110 – 118	56	5	2
Bet 14	(AG) ₁₅	F: GTGTACTTCTCTGGTTGGGGC R: CCCGAGTTCATTACCCAAACT	96 - 128	56	9	8
Bet 15	(AG) ₁₈ (AG A) ₁₃	F: ACTGCCATCACCAGCATGTAG R: GTCCCTTGTTGCTCTCACAAT	186 – 256	56	8	8
Bet 16	(AG) ₉	F: TCTTCAAACACTCAAAGGGACA R: TGTCTATAAATAGGGGCCTCCC	124 - 132	56	5	4

TA: Temperatura de anelamento; A: Número de alelos; AP: Número de alelos privados;

1.4.3 Análise das amostras do Amapá

As estimativas de diversidade genética para cada *locus* são apresentados na Tabela 3. Foi encontrado excesso de heterozigotos na maioria dos loci analisados. Não foi identificado desequilíbrio de ligação nos *loci* analisados. Foi encontrada uma frequência moderada de alelos nulos para Bet01 e baixa para Bet05. Para os demais *loci*, não foram encontrados alelos nulos.

Tabela 3. Estimativas de diversidade genética para cada *locus*, com o intervalo de confiança (IC_{95%}) para estimativa de índice de fixação (*f*) para todos os *loci* e frequências de alelos nulos.

	<i>A</i>	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	<i>f</i> [IC _{95%}]	AN
Bet 01	4	0,591	0,378	0,364 [0,114 – 0,575]	0,13
Bet 05	5	0,643	0,674	-0,049 [-0,304 – 0,163]	0,02
Bet 06	3	0,385	0,477	-0,242 [-0,356 – -0,153]	0
Bet 12	6	0,833	0,978	-0,176 [-0,232 – -0,128]	0
Bet 14	6	0,699	0,867	-0,243 [-0,368 – -0,117]	0
Bet 15	7	0,760	0,911	-0,201 [-0,337 – -0,077]	0
Bet 16	4	0,624	0,711	-0,141 [-0,318 – 0,021]	0
Geral	5	0,648	0,714	-0,103 [-0,176 – -0,051]	

A: Número médio de alelos; *H_e*: heterozigosidade esperada; *H_o*: heterozigosidade observada.

1.5 Discussão

Os *primes* desenvolvidos, especialmente quando marcados com fluorescência, permitiram a visualização nítida dos fragmentos amplificados em bandas facilmente identificáveis, sem muitos *stutters*. A análise de polimorfismo, para a qual foram utilizados seis indivíduos do Acre e seis do Amapá, permitiu detectar poucos alelos em cada *locus* e vários alelos privados. O número de alelos aumentou com o aumento da amostragem, mas muitos dos alelos privados foram mantidos (capítulo 2).

Nas amostras analisadas para validação dos *loci*, foi encontrada uma grande proporção de heterozigotos, com vários dos alelos presentes apenas em heterozigose. Os valores encontrados para *f* nas análises indicaram excesso de heterozigotos para maioria dos *loci*, o que foi observado também para análises utilizando amostras de outras populações. Alelos nulos não foram observados para maioria dos *loci*.

1.6 Conclusão

Os *primers* desenvolvidos mostraram-se úteis para estudos que envolvam a distribuição da espécie ao longo da Amazônia, apesar do pequeno número de alelos observados em cada *locus*, visto que foram detectados alelos privados na maioria dos *loci*. Trabalhos que envolvam o estudo mais aprofundado de cada população individualmente podem requerer um número maior de *loci*. Além disso, esses marcadores constituem uma ferramenta promissora para a execução de análises genéticas que visem obter critérios e indicadores práticos para conservação e manejo florestal da espécie.

Capítulo 02

Diversidade e estrutura genética de populações de *Bertholletia excelsa* ao longo da Amazônia

2.1 Introdução

As matas de terra firme na Amazônia são encontradas desde o oceano Atlântico, a leste, até as encostas orientais da Cordilheira dos Andes, a oeste, e ocupam uma área total estimada em mais de três milhões de quilômetros quadrados. São formações florestais caracterizadas por não serem atingíveis pelas cheias dos rios (Sampaio, 1942; Braga, 1979) e por vegetação composta por árvores de grande porte com formação de dossel (Tadaiesky *et al.*, 2008).

Embora o desmatamento na região Amazônica seja bastante intenso no chamado “arco do desmatamento” (Ferreira *et al.*, 2005), boa parte da extensão ocupada pelas florestas ainda é constituída por áreas contínuas de matas, algumas das quais estão inseridas em unidades de conservação de uso sustentável e de proteção integral ou em terras indígenas. Considerando a continuidade dessas matas, a relativa homogeneidade e estabilidade ambiental, quando comparadas a ambientes de clima temperado, e a alta diversidade genética encontrada em espécies arbóreas tropicais, seria possível imaginar a existência de pequena diferenciação genética entre árvores de diferentes subpopulações encontradas ao longo da Amazônia. Entretanto, existem fatores que podem contribuir para existência de grande heterogeneidade entre indivíduos de diferentes subpopulações. A grande extensão da área ocupada pela floresta somada à dispersão gênica restrita e à alta sensibilidade de espécies tropicais a pequenas diferenças ambientais podem levar a adaptação de um grupo de indivíduos ao micro-habitats em que se encontram ou à atuação de deriva genética em grupos isolados de organismos. Entretanto, são poucos os estudos já realizados a respeito da distribuição da diversidade genética ao longo da floresta amazônica.

A conservação da diversidade genética tem grande importância para a conservação de populações viáveis, pois permite a adaptação a mudanças ambientais (Primack, 1995). A quantificação da diversidade genética, a compreensão da sua distribuição, ou seja, a avaliação da estrutura populacional, juntamente com estudos de fluxo gênico e de sistemas de cruzamento são reconhecidos como importantes ferramentas para a avaliação de efeitos da fragmentação de habitats, para estudos de melhoramento genético e para o desenvolvimento de estratégias de conservação e de manejo de espécies (Erickson *et al.*, 2004; Azevedo, 2007; Vandergast *et al.*, 2007).

Dados de diversidade genética e de estrutura genética populacional podem ser gerados com uso de marcadores moleculares. Estes são segmentos de DNA específicos ou fenótipos moleculares resultantes da expressão gênica, que podem ser muito informativos no que diz respeito a forças evolutivas agindo sobre a evolução molecular. Com o advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), vários tipos de marcadores moleculares foram desenvolvidos, entre os quais estão os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*). Este é um marcador codominante, que permite a discriminação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, baseado na amplificação de fragmentos contendo sequências repetitivas que são altamente polimórficas entre os organismos. O alto grau de polimorfismo, a grande abundância ao longo do genoma de organismos, principalmente eucariotos, e a facilidade com que podem ser isolados, tornam os microssatélites muito úteis em estudos de diversidade genética (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Schlötterer, 2004).

Castanheira-do-brasil ou castanheira-do-pará, como é conhecida, *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Lecythidaceae), objeto da presente pesquisa, é uma árvore de grande porte, monóica, alógama, com flores hermafroditas que é endêmica das matas de terra firme da Amazônia. A polinização é feita por abelhas de médio e grande porte, capazes de alcançar o pólen dentro da flor, como carpinteiras e mamangavas (Apidae e Anthophoridae) (Maués, 2002). As sementes são dispersas principalmente por cotias (*Dasyprocta sp.*) que utilizam as castanhas como alimento e enterram-nas em média entre cinco e 10m de distância a partir do ponto de coleta. Também pode ocorrer, ocasionalmente, dispersão a distâncias maiores por macacos cairara e prego ou araras vermelhas (Shanley; Medina, 2005) ou em eventos de dispersão secundária por cotias (Haugaasen *et al.*, 2010).

2.2.1 Objetivo geral:

Avaliar a estruturação genética de populações de *Bertholletia excelsa* ao longo da Amazônia e verificar se a estruturação é influenciada pela distância que as separa.

2.2.2 Objetivos específicos:

- Estimar a diversidade genética de populações em indivíduos adultos de cinco regiões.
- Analisar estrutura genética intrapopulacional.
- Avaliar estrutura genética entre populações.
- Verificar se a estruturação é influenciada pela distância que separa cada par de populações, testando a correlação entre similaridade genética e distância geográfica.

2.3 Material e métodos:

2.3.1 Locais de coleta

Foram coletadas amostras de *Bertholletia excelsa* em nove localidades distribuídas em cinco estados brasileiros (Figura 1):

A. Acre (AC)

A 1. Fazenda Nova Jerusalém (300 ha): área de Reserva Legal de propriedade particular, situada no sudeste do estado do Acre, município de Plácido de Castro. A fitofisionomia predominante é Floresta Ombrófila. Esta localidade está situada a aproximadamente 125 km da reserva Chico Mendes (AC1).

A 2. Reserva Extrativista Chico Mendes – Resex Chico Mendes (970.570 ha): unidade de conservação (UC) federal de uso sustentável, localizada no sudoeste do estado do Acre, nos municípios de Assis Brasil, Brasiléia, Xapuri, Capixaba, Senador Guimard, Rio Branco e Sena Madureira. A população de aproximadamente 11 mil pessoas vive em vilarejos próximos aos castanhais. A fitofisionomia predominante é Floresta Ombrófila Densa. Nessa reserva foram coletadas amostras no Seringal Cachoeira, localizado a 30 km da sede do município de Xapuri (AC2).

B. Amazonas (AM)

Área de amortecimento da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Amapá – AARDS do Rio Amapá: Áreas de castanhal localizadas próximas à margem do Rio Madeira no centro do estado do Amazonas, município de Manicoré, comunidade de Democracia (614ha e 148 moradores) e comunidade Jatuarana (686ha e 96 moradores). A população extrativista reside em pequenas comunidades dentro dessa área de amortecimento. A fitofisionomia predominante é a Floresta Ombrófila Densa. Nesta área, foram coletadas amostras de duas localidades distantes aproximadamente 2 km (AM1 e AM2).

C. Amapá (AP)

Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru – RDS do Rio Iratapuru (pouco mais de 806.000 ha): unidade de conservação estadual de uso sustentável, localizada no sul do estado do Amapá, nos Municípios de Laranjal do Jarí, Mazagão e Amapari. A população extrativista, constituída de aproximadamente 150 pessoas, reside ao redor da reserva (Haddad *et al.*, 2006). A fitofisionomia predominante é a Floresta Ombrófila Densa. Desta área, foram coletadas amostras de duas localidades distantes aproximadamente 25 km (AP1 e AP2).

D. Pará (PA)

Floresta Nacional do Tapajós – FLONA Tapajós (cerca de 600.000 ha): unidade de conservação federal de uso sustentável, localizada no oeste do estado do Pará, nos municípios de Belterra, Aveiro, Rurópolis e Placas. Sua população estimada é de 1100 famílias, o que corresponde a cerca de 6.000 habitantes, distribuídos em 28 comunidades em cinco áreas de ocupação definidas pelo plano de manejo da UC (Allogio, 2004; Cohenca, 2007). A fitofisionomia é Floresta Ombrófila Mista, com grande predominância de Floresta Ombrófila Densa (98,9%). Nesta unidade, foram coletadas amostras de uma área monitorada de 500 ha de floresta primária (PA).

E. Roraima (RR)

E 1. Vicinal do Itã (18 ha): castanhal particular, localizado no centro do estado de Roraima, município de Caracaraí. A fitofisionomia predominante é Floresta Ombrófila. Esta localidade está situada próxima ao Parque Nacional Viruá (RR1).

E 2. Vicinal 27 (100 ha): área de Reserva Legal de propriedade particular, localizada no sudeste do estado de Roraima, no município de São João do Baliza. A fitofisionomia predominante é Floresta Ombrófila. Esta localidade está situada próxima a terras indígenas e a aproximadamente 150 km de Caracaraí (RR2).

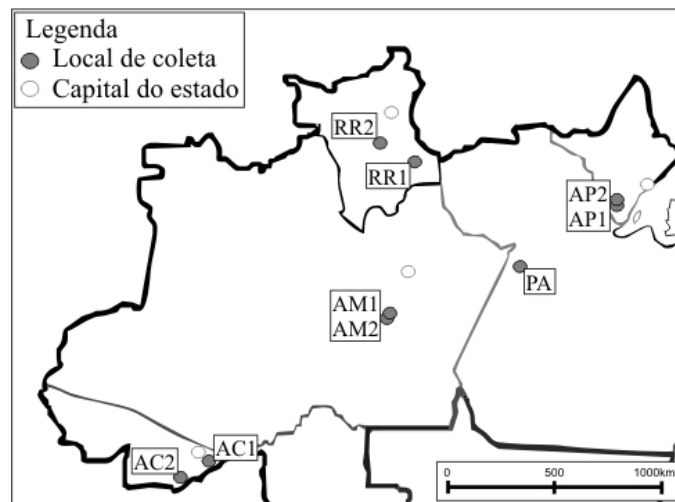


Figura 1. Locais de coleta.

2.3.2 Coletas

Em cada local foi coletado material de árvores adultas, sendo consideradas adultas apenas árvores reprodutivas. Folhas foram coletadas das árvores da Floresta Nacional do Tapajós (PA) e congeladas em seguida. Nas demais localidades, um disco de câmbio vascular foi extraído de cada árvore e conservado em 1ml de tampão de transporte (300µl de tampão CTAB 2%; 700µl de etanol absoluto) mantido entre 4°C e 10°C até a extração de DNA. Para cada indivíduo foram tomadas as coordenadas geográficas, obtidas com auxílio de um equipamento de GPS (*Global Positioning System*) (Tabela 1). Cada um dos nove locais de coleta foi identificado *a priori* como uma subpopulação.

Tabela 1. Locais de coleta, com seus respectivos tamanho amostral (*N*), localização e data de coleta.

Amostra	<i>N</i>	Local	Coordenadas	Data
AC 1	46	Fazenda Nova Jerusalém – AC	10°12'S 67°23'W	01 a 03/2009
AC 2	46	Resex Chico Mendes – AC	10°49'S 68°23'W	01 a 03/2009
AM 1	35	AARDS do Rio Amapá – AM	5°47'S 61°25'W	07/2010
AM 2	35	AARDS do Rio Amapá – AM	5°46'S 61°24'W	07/2010
AP 1	45	RDS do Rio Iratapuru – AP	0°28'S 52°34'W	08/2008
AP 2	46	RDS do Rio Iratapuru – AP	0°16'S 52°31'W	08/2008
PA	46	FLONA Tapajós – PA	2°25'S 54°43'W	01 a 03/2009
RR 1	34	Vicinal Itã – RR	01°48'N 41°07'W	10/2007
RR 2	46	Vicinal 27 – RR	00°57'N 59°54'W	08 a 12/2007

2.3.3 Extração de DNA

DNA genômico foi extraído das folhas e dos discos de câmbio por meio do procedimento de CTAB 2% (Doyle; Doyle, 1987) adaptado por Machado *et al.* (2002).

2.3.4 Análises populacionais

Foram selecionados 11 pares de *primers* para a genotipagem das amostras, dos quais sete foram desenvolvidos no presente trabalho, identificados como “Bet”, e quatro desenvolvidos por Reis *et al.* (2009) identificados como “Bex” (Tabela 2).

A separação dos fragmentos foi feita com analisador automático de DNA ABI 3700, no qual a corrida eletroforética é feita através de capilares preenchidos com polímero. Esse tipo de equipamento permite a montagem de conjuntos *multiplex* de *loci*, ou seja, a análise de mais de um *locus* por corrida. Foram montados conjuntos duplex de *loci* amplificados com *primers* marcados com fluorocromos diferentes. A alta precisão obtida com a utilização desse tipo de equipamento é devida à possibilidade de misturar os fragmentos a serem analisados juntamente com o marcador padrão de peso molecular, graças à marcação com fluorocromos.

A detecção dos picos de fluorescência e a genotipagem foram feitas utilizando os *softwares* GeneScan e Genotyper, respectivamente (Figura 2). A partir da detecção dos tamanhos dos fragmentos amplificados com cada par de *primers* para cada indivíduo, foi gerada uma planilha utilizada para as análises e estimativas.

Tabela 2. *Primers* SSR utilizados.

Locus	Motivos de repetição	Sequência do iniciador (5' – 3')	Tamanho (pb)
Bet 01	(AG) ₆	F: TTTAAGTATGATGAAAGGCGGACT R: TACGCAGAACAGACTCGCTAAA	242
Bet 05	(TC) ₁₄	F: TAATCTCACAACAAATAACG R: CTAGCTTGATCCTAGAGAAA	108
Bet 06	(TC) ₇	F: CTCTAGGATCAAGCTAGCCCAA R: AGGTTATGCTCCAAATAGCAGG	149
Bet 12	(TC) ₁₁	F: ATAAGGACCGCCCATCATC R: ATAGCGAGAGCAACCTTTGAAC	115
Bet 14	(AG) ₁₅	F: GTGTACTTCTCTGGTTGGGGC R: CCCGAGTTCATTACCCAAACT	113
Bet 15	(AG) ₁₈ (AGA) ₁₃	F: ACTGCCATCACCAGCATGTAG R: GTCCTTGTGGTCTCTCACAAT	198
Bet 16	(AG) ₉	F: TCTCAAACACTCAAAGGGACA R: TGTCTATAAATAGGGGCCTCCC	136
Bex 02	(CT) ₈ (CA) ₉ (CT) ₅ (CA) ₂	F: GCCATGTTCTCTACAGTCTC R: AGTCGGACATCCTTCGTGCT	113
Bex06	(CT) ₁₇ (CCCT) ₃	F: TTGATCTTCGCAAGGTCGGT R: ACTTCCTCAATCCATCGAGT	230
Bex 09	(CT) ₃₂	F: TATTCCATGGTCCTCCGT R: AGTCAATCATCTTCAAGAGT	158
Bex 12	(GC) ₄ (AC) ₅ A(TG) ₂ CTAT(GA) ₂₀	F: AATTAGCAACAATGCACTGA R: ATTCCGTAACATGCTCTTCT	214

Bet: desenvolvidos por Azevedo *et al.* (2008); Bex: desenvolvidos por Reis *et al.* (2009).

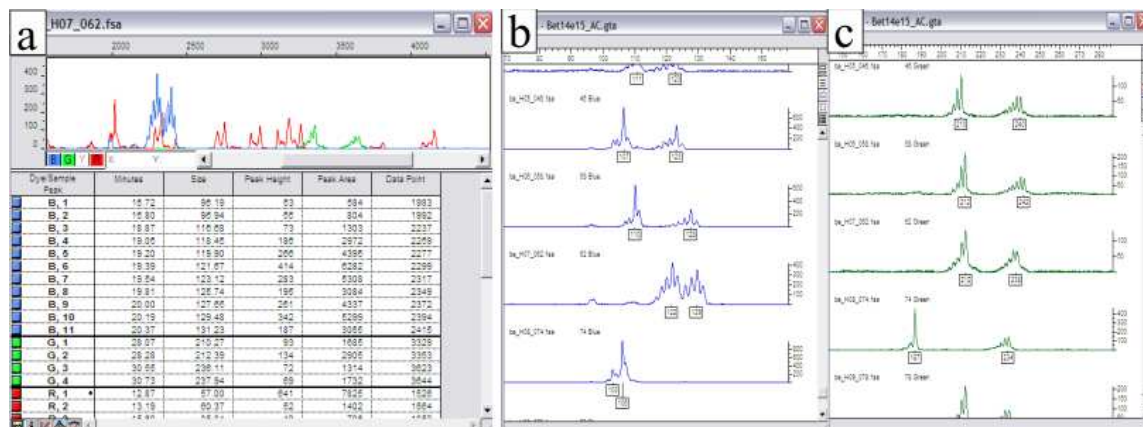


Figura 2. Sistema *duplex* de *loci* em analisador automático de fragmentos ABI3700. a) Imagem da detecção de picos de fluorescência dos fragmentos (verde e azul) e do marcador interno (vermelho) com GeneScan; b, c) detecção dos tamanhos de fragmentos com Genotyper.

2.3.5 Análise de dados

A diversidade genética de cada subpopulação foi caracterizada por meio das estimativas do número médio de alelos por *locus* (A), das frequências alélicas, de heterozigosidade observada (H_o) e esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). Também foi estudada a estruturação da diversidade genética por meio das estatísticas F de Wright, utilizando f e θ como estimadores de F_{IS} e F_{ST} , respectivamente (Weir; Cockerham, 1984). Teste exato de Fisher foi utilizado para testar diferenças entre cada par de subpopulações. O teste para detecção de desequilíbrio de ligação (DL) foi feito com base em permutações. Foi utilizada correção de Bonferroni (Holm, 1979) para diminuir a probabilidade de erro tipo I nas estimativas de índice de fixação e de desequilíbrio de ligação. O *software* FSTAT (Goudet, 1995) foi utilizado para realizar as estimativas e os testes.

A estrutura em micro-escala foi analisada com base na estimativa de coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos ($\hat{F}_{ij}$), calculado utilizando o estimador de J. Nason (Loiselle *et al.* 1995), que não pressupõe EHW, utilizando o *software* SPAGeDi versão 1.2 (Hardy; Vekemans, 2002). Foram definidas classes de distância geográfica de 50m ou 100m entre pares de indivíduos, dependendo da subpopulação. Uma classe adicional foi criada, definida como $F_{intra-ind}$, que corresponde ao coeficiente de endogamia. Foi feita regressão entre o coeficiente de parentesco médio ($\hat{F}_{ij}$) e as classes de distância geográfica definidas. O erro padrão (EP) foi calculado por meio de 1000 reamostragens *Jackknife* de *loci* e foi utilizado para calcular o intervalo de confiança do coeficiente de parentesco ($IC_{95\%} = \hat{F}_{ij} \pm 1.96EP$) para cada classe de distância. A estruturação genética espacial foi quantificada por meio do cálculo de $S_p = b\text{-log}/(1 - \hat{F}_1)$, em que $b\text{-log}$ é a inclinação da reta de regressão entre o coeficiente de parentesco e o logaritmo da distância geográfica entre as pares de indivíduos; e $\hat{F}_1$ é a média do coeficiente de parentesco entre todos os indivíduos presentes na primeira classe de distância que inclua todos os pares de vizinhos (Vekemans; Hardy, 2004). Foi testada a hipótese nula de ausência de estruturação ($b\text{-log} = 0$) por meio de um teste de Mantel e obtida significância por meio de 1000 reamostragens *bootstrap*. O correlograma entre o coeficiente de parentesco e as classes de distância foi construído para visualizar a estrutura genética espacial em cada subpopulação.

Estimativas das distâncias genéticas sem viés de Nei (1978) entre subpopulações foram utilizadas para construção de dendrograma para a qual foi empregado método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (Sneath; Sokal, 1973) com o *software* TFPGA (Miller, 1997). A consistência dos nós foi calculada pelo método de reamostragem com 1000 *bootstraps*.

A inferência da estrutura populacional e do número de grupos existentes e a atribuição dos indivíduos amostrados a cada grupo foram realizadas com o *software* Structure (Pritchard *et al.*, 2000), que utiliza dados de genótipos *multilocus* para inferência de estrutura populacional, com uma abordagem Bayesiana, pelo método Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Foi utilizado modelo que admite mistura de genomas, com número de grupos (K) variando de um a 12, com 600mil reamostragens sendo as 100mil primeiras descartadas (*burnins*) e 10 repetições independentes. Este *software* permite identificação de variação clinal, mesmo com pequena diferenciação entre os indivíduos amostrados (Chen *et al.* 2007). Para detecção do número de grupos mais provável, foi utilizada a estatística descrita por Evanno *et al.* (2005), baseada na taxa de mudança na probabilidade dos dados entre os sucessivos valores de K . O valor de K que melhor representa a estruturação das populações pode ser identificado pelo pico no valor de ΔK .

Após a identificação da estrutura genética populacional por meio das estatísticas-F, foi detectado o número de alelos privados (AP) com o *software* GDA 1.0 (Lewis; Zaykin, 2001) para subpopulação e para subpopulações agrupadas por estado em que se localizam.

Foram feitas estimativas de estrutura populacional (θ) entre as amostras organizadas em diferentes níveis hierárquicos. As estimativas de θ e de seus intervalos de confiança, obtidos por meio de 1000 reamostragens *bootstrap*, foram feitas utilizando o *software* GDA 1.0 (Lewis; Zaykin, 2001).

A correlação entre distância genética de Nei (1978) e distância geográfica entre cada par de subpopulações foi testada utilizando o teste de Mantel. O nível de significância do teste foi feito com 1.000 permutações. Além da distancia geográfica entre os pares de subpopulações, também poderia existir efeito de outra variável sobre a estruturação genética das castanheiras. Uma possível variável seria a presença de

isolamento pelas sub-bacias hidrográficas do Amazonas, com as populações separadas pelos principais rios da bacia Amazônica, visto que a castanheira é uma espécie de terra-firme, dispersa principalmente por mamíferos de pequeno porte. A correlação entre distância genética de Nei (1978) e a presença do par de subpopulações na mesma sub-bacia (0) ou em sub-bacias diferentes (0) também foi testada por meio de um teste de Mantel. Esses testes foram feitos com o *software* TFPGA (Miller, 1997).

2.4 Resultados

As estimativas de diversidade genética para os 11 loci analisados, em cada subpopulação, são apresentadas na Tabela 3. Nas subpopulações analisadas, o número médio de alelos observado variou de 3,36 a 6,18 alelos por *locus* por subpopulação; a heterozigosidade observada variou de 0,65 a 0,81; e a heterozigosidade esperada no Equilíbrio de Hardy-Weinberg variou de 0,55 a 0,68. Foi observado índice de fixação significativamente menor que zero em cinco subpopulações, indicando excesso de heterozigotos, e não significativamente diferente de zero nas quatro demais subpopulações.

Tabela 3. Estimativas de diversidade genética nas subpopulações.

Subpop	<i>N</i>	Alelos	<i>A</i>	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	<i>f</i>
AC 1	46	69	5,91	0,649	0,677	-0,043 ^{ns}
AC 2	46	72	6,18	0,641	0,645	-0,005 ^{ns}
AM 1	34	40	3,36	0,551	0,809	-0,486*
AM 2	35	50	4,18	0,581	0,802	-0,427*
AP 1	45	65	5,55	0,672	0,712	-0,062 ^{ns}
AP 2	46	67	5,73	0,677	0,691	-0,036 ^{ns}
PA	45	52	4,36	0,573	0,775	-0,328*
RR 1	34	59	5,00	0,612	0,736	-0,245*
RR 2	46	65	5,55	0,598	0,700	-0,188*

N: tamanho amostral; Alelos: número total de alelos; *A*: número médio de alelos por *locus*; *H_e*: heterozigosidade esperada; *H_o*: heterozigosidade observada; *f*: estimador de F_{IS} ; ns: não significativo; * Significativo ($p < 0,001$).

Em todos os *loci* analisados, foram observados um ou dois alelos com frequências muito maiores que as dos demais. Nas subpopulações de um mesmo estado, foram encontrados os mesmos alelos e em frequências semelhantes. Por sua vez, subpopulações de estados diferentes apresentaram composição alélica diferente, com alguns alelos comuns. Estes, apesar de presentes em vários estados, foram encontrados, em sua maioria, em frequências bastante variáveis (Figura 3). As amostras do Amazonas e do Pará apresentaram poucos alelos em todos os *loci*, com dois ou três alelos com frequências altas e poucos alelos raros.

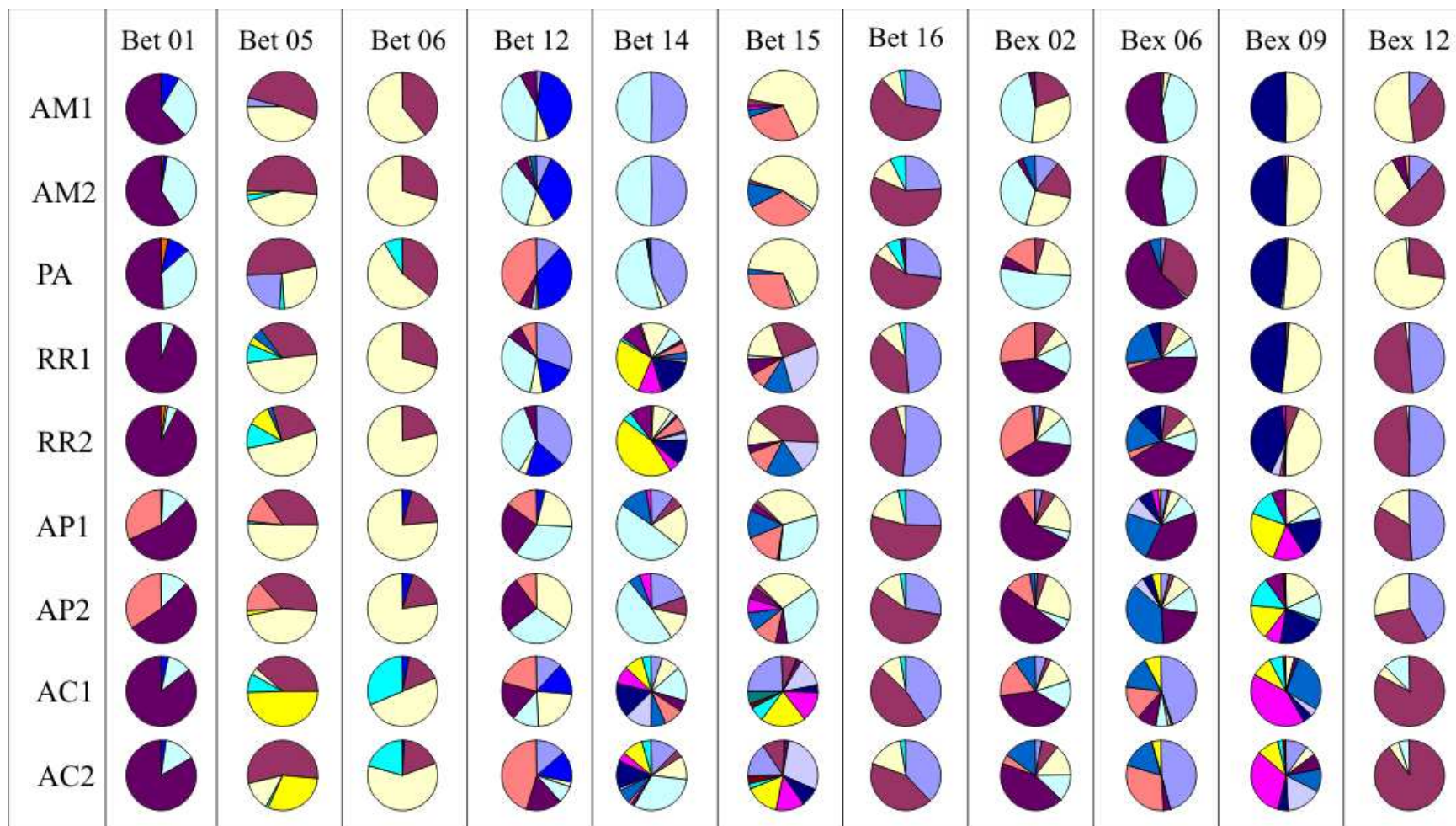


Figura 3. Representação das frequências alélicas dos *loci* analisados para cada subpopulação.

Alelos exclusivos foram encontrados em pelo menos uma subpopulação de cada estado. Além disso, o agrupamento de amostras de cada estado evidenciou um número maior de alelos privados do que quando analisadas as subpopulações individualmente (Tabela 4).

Tabela 4. Número total de alelos privados em cada subpopulação (AP_s) e em subpopulações do mesmo estado (AP_e).

estado	subpopulação	AP_s	AP_e
Acre	AC 1	1	6
	AC 2	-	
Amazonas	AM 1	-	3
	AM 2	3	
Amapá	AP 1	1	5
	AP 2	-	
Pará	PA	1	1
Roraima	RR 1	-	4
	RR 2	2	

Foi encontrado desequilíbrio de ligação (DL) apenas em um par de *loci* analisados (Bet05 e Bet06) nas duas subpopulações do Acre.

A análise de estrutura intrapopulacional permitiu identificar estruturação genética espacial significativa em cinco das subpopulações analisadas, com correlação negativa e significativa entre $\hat{F}_{ij}$ e o logaritmo da distância geográfica entre os pares de indivíduos (Tabela 5). Os valores encontrados para quantificação da estrutura genética espacial (S_p) nas subpopulações que apresentaram estruturação significativa variaram entre 0,001 e 0,033.

Os resultados para estimativa do coeficiente de endogamia indicam ausência de endogamia e excesso de heterozigotos em todas as subpopulações. A representação gráfica da estruturação genética espacial em micro-escala para cada subpopulação pode ser observada na Figura 4.

Tabela 5. Estimativas de estrutura em micro-escala de cada subpopulação.

	$b\text{-log}$	$\hat{F}_{\text{intra-ind}}$	$\hat{F}_1$	$\hat{F}_2$	S_p
AC1	-0.031 ^{**}	-0.062 [*]	0.059 ^{**}	0.018 ^{ns}	0.033
AC2	-0.011 [*]	-0.019 ^{ns}	0.019 [*]	0.004 ^{ns}	0.012
AM1	-0.005 ^{ns}	-0.503 ^{**}	0.032 ^{**}	0.014 ^{ns}	0.004
AM2	-0.001 ^{ns}	-0.398 ^{**}	0.006 ^{ns}	0.015 ^{ns}	0.001
AP1	-0.006 ^{ns}	-0.088 ^{**}	0.061 ^{**}	0.014 ^{ns}	0.008
AP2	-0.012 [*]	-0.019 ^{ns}	0.043 ^{**}	0.008 ^{ns}	0.013
PA	0.001 ^{ns}	-0.353 ^{**}	0.013 ^{ns}	-0.019 ^{ns}	-0.001
RR1	-0.014 ^{**}	-0.191 ^{**}	0.028 ^{**}	-0.008 ^{ns}	0.014
RR2	-0.001 ^{ns}	-0.187 ^{**}	0.003 ^{ns}	0.006 ^{ns}	0.001

$b\text{-log}$: inclinação da curva de regressão de $\hat{F}_{ij}$ e $\log(\text{distância geográfica})$; $\hat{F}_{\text{intra-ind}}$: estimativa do coeficiente de endogamia; $\hat{F}_1$: Média do coeficiente de parentesco entre indivíduos da primeira classe de distâncias; $\hat{F}_2$: Média do coeficiente de parentesco entre indivíduos da segunda classe de distâncias; S_p : quantificação da estrutura em micro-escala; ^{ns}: não significativo; ^{*} significativo ($p < 0,05$); ^{**} significativo ($p < 0,01$).

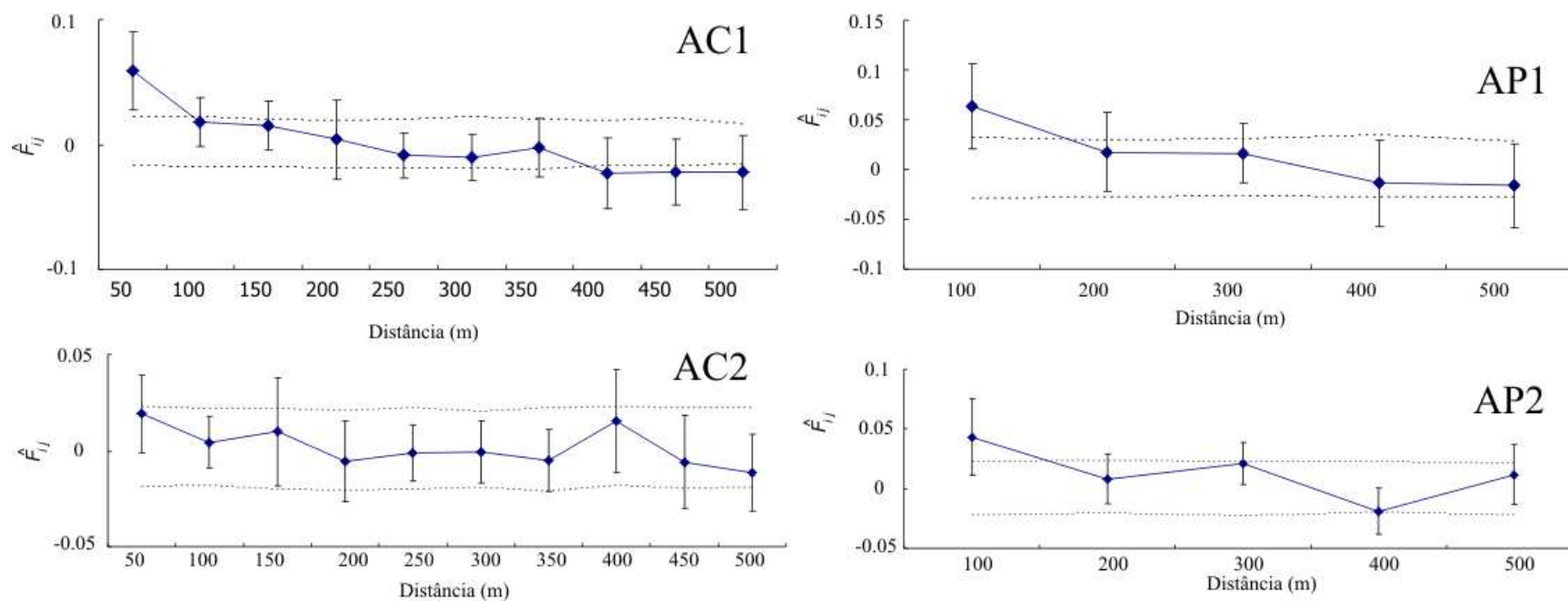


Figura 4. Representação da média do coeficiente de parentesco em função das primeiras classes de distância (até 500m) para cada subpopulação analisada. Barras indicam o intervalo de confiança do coeficiente de parentesco ($IC_{95\%}$) e linhas tracejadas indicam os valores críticos de rejeição ($VC_{95\%}$) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial (contínua).

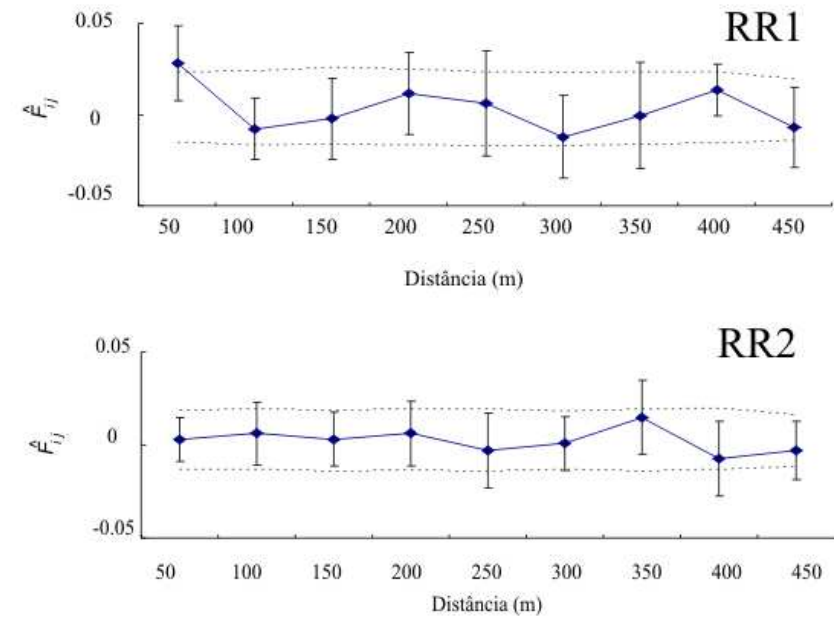
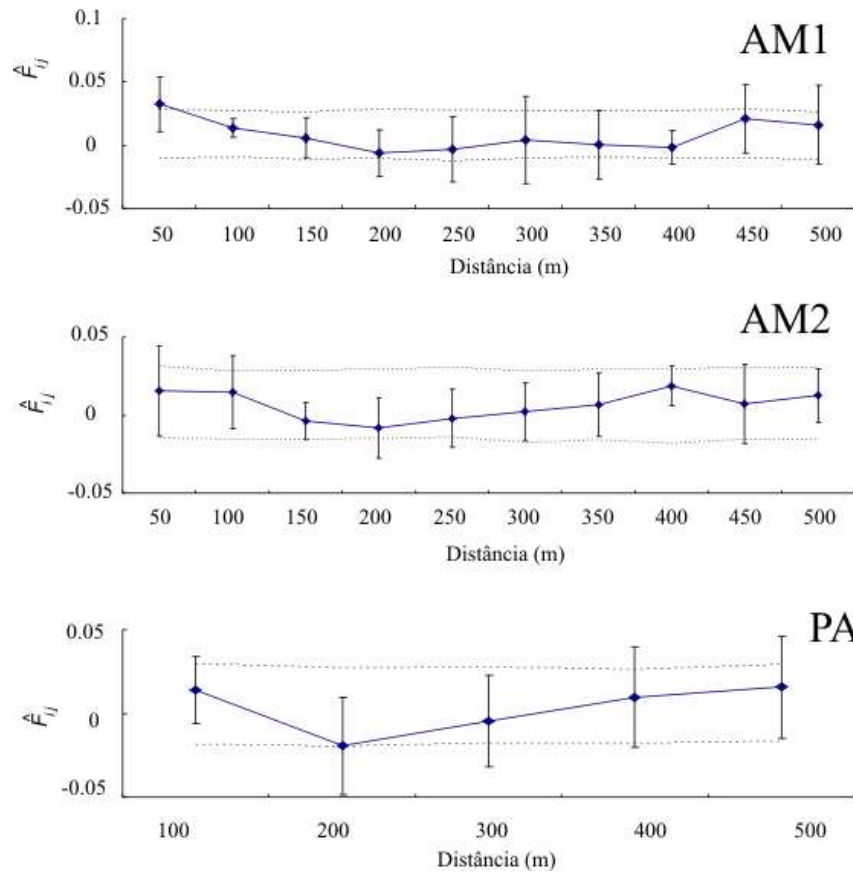


Figura 4 (continuação). Representação da média do coeficiente de parentesco em função das primeiras classes de distância (até 500m) para cada subpopulação analisada. Barras indicam o intervalo de confiança do coeficiente de parentesco ($IC_{95\%}$) e linhas tracejadas indicam os valores críticos de rejeição ($VC_{95\%}$) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial.

As estimativas feitas para estruturação populacional, resultantes da análise hierárquica, são apresentados na Figura 5.

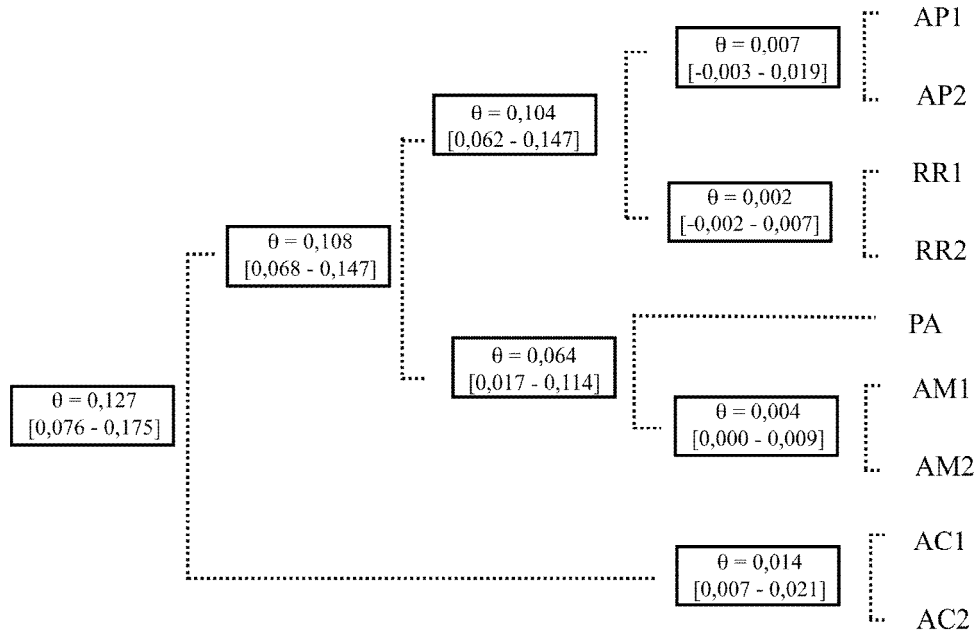


Figura 5. Diagrama dos valores de θ , como estimativas de estrutura populacional, entre grupos de amostras organizadas em diferentes níveis hierárquicos, com seus respectivos intervalos de confiança (IC_{95%}).

As estimativas de F_{ST} obtidas para cada par de subpopulações indicaram que subpopulações presentes em estados diferentes, separadas por distâncias maiores que 400km, apresentam diferenciação significativa, diferentemente de subpopulações separadas por distâncias menores que 150km, exceto pelas amostras do Acre (Tabela 6). Os valores para estimativas de distância genética de Nei (1978) para amostras de um mesmo estado foram pequenas ($D \leq 0,026$), enquanto as distâncias genéticas entre amostras de diferentes estados tiveram grande variação ($0,076 \leq D \leq 0,698$). O dendrograma obtido está representado na Figura 6.

Tabela 6. Valores das estimativas de θ (acima da diagonal) e distância genética não-viesada de Nei (1978) (abaixo da diagonal) para cada par de subpopulações.

θ D	AC 1	AC 2	AM 1	AM 2	AP 1	AP 2	PA	RR 1	RR 2
AC1		0,014	0,235	0,210	0,150	0,154	0,244	0,154	0,160
AC2	0,026		0,209	0,179	0,125	0,137	0,228	0,135	0,145
AM1	0,616	0,488		0,005 ^{ns}	0,135	0,139	0,058	0,151	0,172
AM2	0,551	0,415	0		0,112	0,121	0,071	0,129	0,149
AP1	0,418	0,315	0,270	0,230		0,007 ^{ns}	0,146	0,089	0,107
AP2	0,442	0,366	0,286	0,260	0,013		0,133	0,102	0,120
PA	0,698	0,600	0,076	0,102	0,319	0,283		0,179	0,201
RR1	0,372	0,303	0,227	0,241	0,189	0,228	0,371		0,002 ^{ns}
RR2	0,376	0,322	0,325	0,285	0,228	0,268	0,434	0	

Negrito: Significativo ($p < 0,001$); ^{ns}: Não significativo.

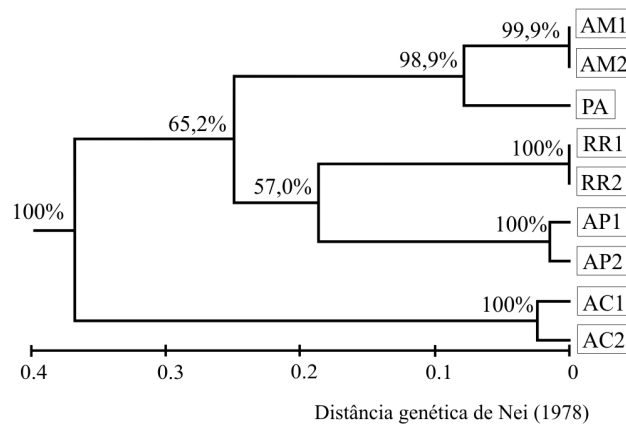


Figura 6. Dendrograma UPGMA das subpopulações (valores de *bootstrap* com 1000 reamostragens).

Análise de estrutura populacional permitiu identificar quatro grupos distintos. Para $K=4$, o valor de ΔK foi mais alto do que para os demais, com pequena variância e houve pequena variação entre resultados para as diferentes replicações (Figura 7a, b). Para $K=2$ e $K=5$, também foram observados valores de ΔK um pouco mais altos do que para os demais e seus gráficos também foram analisados.

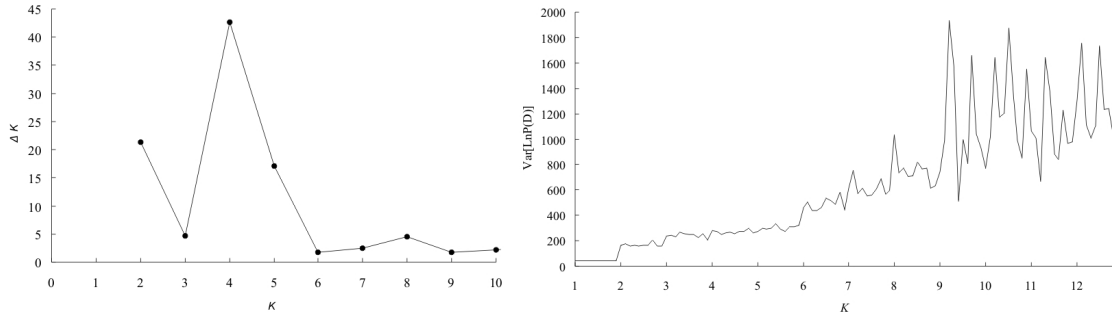


Figura 7. Resultados gráficos da análise para identificação do valor de K . a) ΔK em função de K , calculado para 10 replicações; b) Variância do $\ln$ obtido a partir da verossimilhança dos dados em cada etapa do MCMC.

No gráfico no qual as amostras foram divididas em dois grupos (Figura 8), os indivíduos do Acre foram atribuídos a um grupo diferente das demais subpopulações. As amostras de Roraima mostraram indicações de ocorrência de grande mistura genomas, com até 40% do genoma composto por alelos em frequências mais parecidas com as das amostras do Acre.

No caso de quatro grupos ($K=4$), as subpopulações do Amazonas e do Pará foram agrupadas e os demais grupos foram formados por amostras de diferentes estados. Para $K=5$, cada grupo é formado por indivíduos amostrados em um estado. Nesses dois últimos casos, poucos indivíduos foram atribuído a uma população diferente da qual foi coletada (Figura 8).

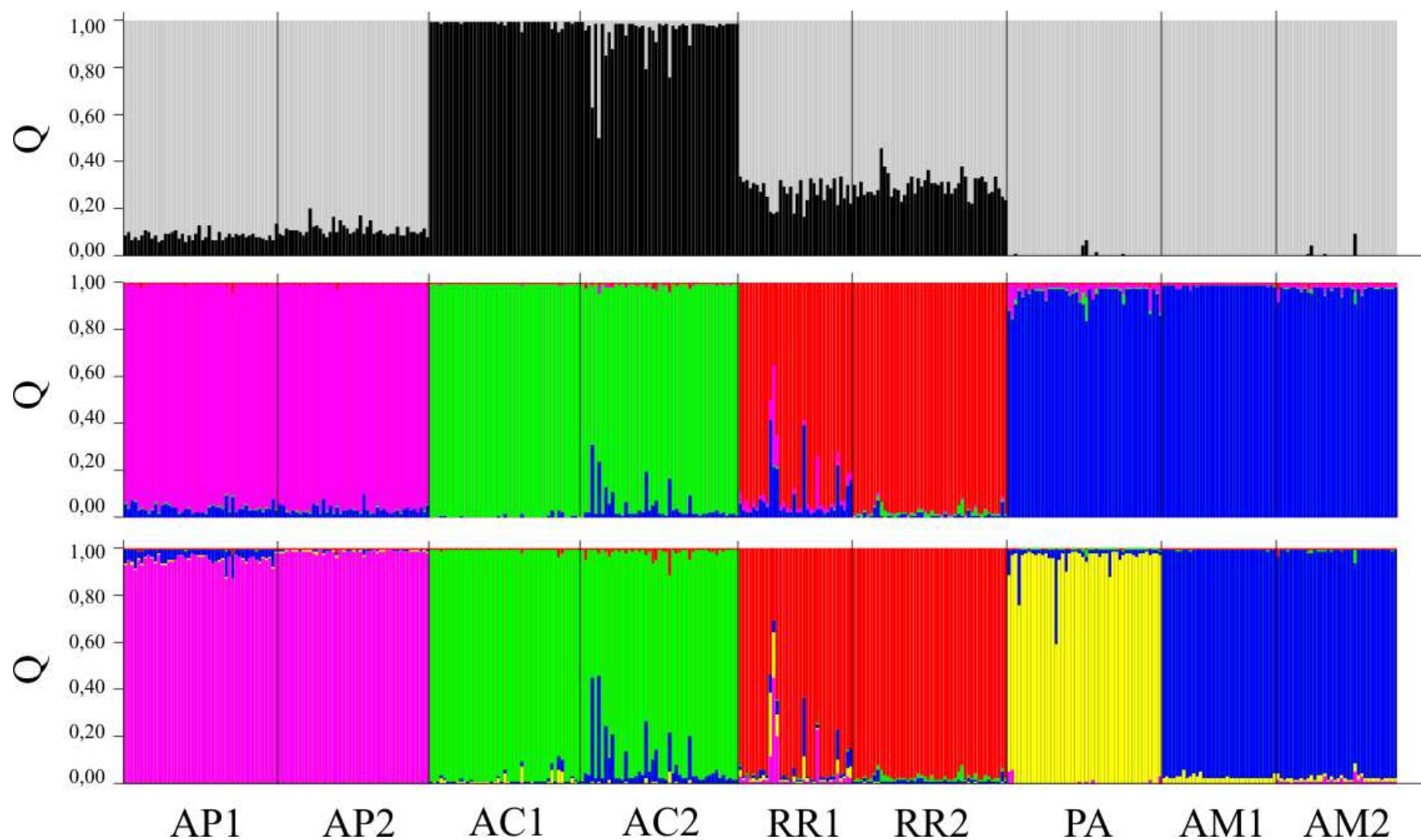
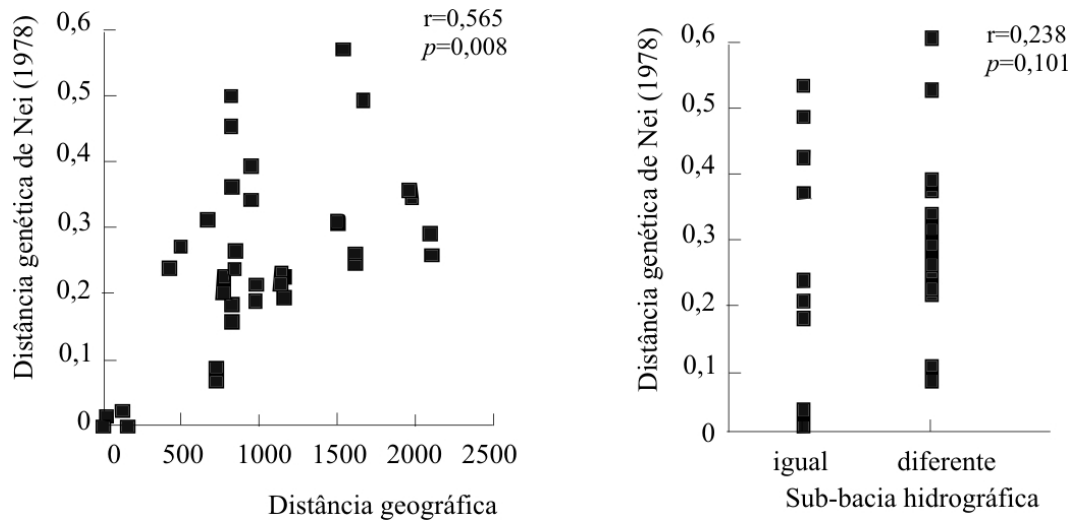


Figura 8. Resultado do teste de homogeneidade de *pool* gênico, com amostras ordenadas por subpopulação, para $K=2$ (acima), $K=4$ (centro) e $K=5$ (abaixo).

O teste de Mantel mostrou correlação negativa e significativa entre as distancias genética (Nei, 1978) e geográfica entre pares de subpopulações ($r=-0,565$; $p<0,008$). Não foi encontrada correlação significativa entre distância genética e a sub-bacia hidrográfica onde se encontrava cada subpopulação ($r=0,238$; $p=0,101$) (Figura 9).



2.5 Discussão

O número médio de alelos por *locus* encontrado foi pequeno, sendo menor do que o comumente encontrado em estudos de espécies arbóreas com esse tipo de marcador e com tamanho amostral semelhante (Collevatti *et al.*, 2001; Bittencourt; Sebbenn, 2009; Bizoux *et al.*, 2009).

Comparados a resultados de estudos com outras espécies arbóreas amazônicas (Azevedo, 2007; Lacerda *et al.*, 2008; Le Guen *et al.*, 2009; Tarazi, 2009), os valores neste trabalho para H_o foram tão altos quanto os comumente observados e os valores de H_e foram um pouco baixos. Em geral, também é observado índice de fixação (f) positivo, o que não foi observado neste trabalho. Nas subpopulações do Acre (AC1 e AC2) e do Amapá (AP1 e AP2) o índice de fixação (f) não foi significativamente diferente de zero; nas cinco demais subpopulações os valores de f foram negativos e significativos. Esse resultado pode indicar grande importância da fecundação cruzada e existência de outros fatores que levam ao excesso de heterozigotos como mecanismos de auto-incompatibilidade, já descritos para espécie, e seleção a favor de heterozigotos, que pode ser encontrada em espécies arbóreas (Hansson; Westerberg, 2002; Balloux, 2004; Hufford; Hamrick, 2007).

A análise de autocorrelação espacial mostrou, em quatro das nove subpopulações amostradas (AC1, AC2, AP2 e RR1), uma pequena, contudo significativa, estruturação com os maiores coeficientes de parentesco observados entre indivíduos distantes até 100m. Dessas subpopulações AC1, AC2 e AP2 apresentaram valores de f não significativos, em contraste com as demais populações que mostraram excesso de heterozigotos. Esses resultados podem indicar a presença de fatores atuando na estruturação em micro-escala, ainda que esta seja muito pequena.

Mecanismos de auto-incompatibilidade já foram descritos para castanheira e parecem estar relacionados ao reconhecimento no momento da fecundação do óvulo e à quantidade mínima de óvulos fecundados para que haja desenvolvimento do fruto (Müller, 1980; O'Malley *et al.*, 1988; Schifino-Wittmann; Dall'Agnol, 2002; Cavalcante, 2008). Esses mecanismos favorecem a reprodução cruzada das castanheiras e têm grande importância na manutenção da diversidade genética dentro das populações, o que deve ser levado em consideração no desenvolvimento de planos de manejo e conservação de *B.*

excelsa. Considerando que não ocorre fecundação entre óvulo e pólen da mesma flor e que a taxa de fecundação com pólen de flores da mesma planta é muito baixa, é importante que seja mantida variabilidade genética dentro de cada população para evitar déficits de fecundidade.

Não foi possível identificar até qual distância existe estruturação, ou seja, em qual classe de distância a função do coeficiente de parentesco cruza o eixo x pela primeira vez, uma vez que esse ponto é dependente da escala espacial utilizada na amostragem em cada local. Portanto, foram comparadas apenas as inclinações das retas resultantes das regressões entre o coeficiente de parentesco e o logaritmo das distâncias entre pares de indivíduos (b -log), que não depende do esquema de amostragem (Vekemans; Hardy, 2004).

Os padrões de autocorrelação encontrados dentro de cada subpopulação foram semelhantes aos encontrados para espécies arbóreas, auto-incompatíveis, com dispersão de pólen e sementes realizada por animais (Vekemans; Hardy, 2004). A dispersão de sementes de castanheira em geral é restrita a poucas dezenas de metros, resultando em uma agregação espacial dos indivíduos que compartilham um ancestral comum recente, e possivelmente essa agregação é a responsável pela estruturação em micro-escala encontrada em *B. excelsa* (Kalisz *et al.* 2001). A dispersão das castanhas é realizada principalmente por cotias, que em geral levam sementes até 10m de distância a partir do ponto de coleta. Por outro lado, existem evidências de raros eventos dispersão a distâncias maiores sendo realizados tanto por cotias como por outros animais como macacos-prego e araras-vermelhas por centenas de metros (Peres; Baider, 1997). Cotias também podem realizar dispersão secundária, levando sementes anteriormente enterradas a uma distância de até 100m (Haugaasen *et al.*, 2010). Além disso, as sementes podem estar localizadas a dezenas de metros do tronco da árvore-mãe, visto que os frutos são produzidos em ramos apicais da copa, que pode alcançar 35m de diâmetro, e várias árvores estão presentes em terrenos inclinados, onde os frutos podem rolar e alcançar distâncias maiores em relação ao ponto de queda. Assim, a estruturação genética significativa encontrada dentro de algumas subpopulações pode ser explicada pela restrita dispersão de sementes. Os baixos valores observados para essa estruturação, ou mesmo a ausência desta em algumas das subpopulações, podem estar relacionados à eficiente

dispersão de pólen e a eventos de dispersão de sementes a distâncias maiores que, apesar de raros, parecem ter grande importância na estrutura genética espacial das castanheiras. No entanto, o marcador utilizado não permite separar os efeitos de dispersão de pólen e sementes na estrutura genética encontrada.

A partir de estudos demográficos, foi constatado que castanheiras adultas apresentam distribuição aleatória dentro de cada castanhal, com indivíduos jovens agrupados ao redor dos adultos (Wadt *et al.*, 2005). Em todas as áreas em que foram coletadas as amostras para este estudo é praticado extrativismo de castanha e foram observados poucos indivíduos jovens e plântulas ao redor das árvores amostradas. Há indicações de que o extrativismo pode causar o declínio das populações de castanheira, com redução do tamanho populacional em longo prazo, devido à baixa taxa de recrutamento (Peres *et al.*, 2003). Esse pequeno número de plântulas e de jovens pode ser causado pela retirada das sementes do local e também pelo pisoteio de plântulas que estejam germinando, mas ainda não foram feitos estudos para analisar os reais impactos de cada um.

Nos locais de coleta no estado do Amazonas, extrativistas de castanha relataram que cotias entram no castanhal para coletar castanhas, mas alimentam-se na unidade de conservação vizinha, onde não há presença humana. Esse tipo de comportamento aumenta a distância de dispersão das sementes e pode vir a diminuir a estrutura intrapopulacional. Informações mais precisas a respeito da atuação efetiva dos diferentes dispersores, de distância entre a árvore-mãe e local de germinação da semente e de estrutura genética nos diferentes estágios de desenvolvimento da castanheira podem levar a uma melhor compreensão das causas da estruturação genética espacial e dos efeitos da exploração da castanha para as populações de *B. excelsa*.

A diferenciação encontrada entre as subpopulações foi pequena entre subpopulações próximas ($\theta < 0,02$). Para subpopulações mais distantes, os valores de θ apresentaram grande variação, como por exemplo os valores observados para pares de subpopulações separadas por aproximadamente 700 a 820km: bastante altos ($\theta=0,235$), moderados ($\theta=0,107$) e baixos ($\theta=0,058$). Esses resultados são semelhantes aos obtidos em estudos com outras espécies arbóreas de vida longa, exogâmicas, de ampla

distribuição, como são as castanheiras (Hamrick; Goldt, 1996; Avise; Hamrick, 1996; Lemes *et al.*, 2003; Le Guen *et al.*, 2009). Os valores encontrados para estimativas de θ podem ser resultado de um conjunto fatores, tais como continuidade da floresta; dispersão de pólen eficiente e longevidade das árvores, o que possibilita que cada indivíduo passe por inúmeros eventos reprodutivos; ou tempo de divergência insuficiente, no caso de subdivisão recente de uma grande população.

Nas comparações entre subpopulações mais distantes, também foram observadas frequências alélicas bastante diferentes, com variação na composição e na proporção de alelos presentes. Além disso, foram observados alelos privados em mais da metade das subpopulações analisadas.

As subpopulações pertencentes a cada estado foram agrupadas tanto no dendrograma como na análise de atribuição de indivíduos. Alguns indivíduos apresentaram alta probabilidade de serem originários de uma subpopulação diferente daquela em que foram coletados e outros apresentaram indício de mistura de genomas.

Isolamento-por-distância é um mecanismo frequentemente utilizado para explicar a diferenciação populacional de plantas, que muitas vezes apresentam dispersão gênica limitada (Wright, 1940; Walter; Epperson, 2004). Também poderia ser uma explicação para grande parte da estruturação encontrada entre as subpopulações de castanheira, uma vez que a correlação entre similaridade genética e distância geográfica foi alta e significativa, mas outros modelos também podem ser testados.

Seringueiras (*Hevea brasiliensis*), assim como as castanheiras, são árvores exogâmicas, de vida longa, distribuídas ao longo da Amazônia, com polinização realizada por insetos. Le Guen e colaboradores (2009), em um estudo sobre as causas da estruturação genética dessa espécie, concluíram que a sub-bacia onde se localiza a árvore, juntamente com isolamento-por-distância, explicariam a estruturação encontrada. Considerando as semelhanças ecológicas entre seringueiras e castanheiras, a hipótese de isolamento das castanheiras de diferentes sub-bacias hidrográficas foi testada no presente estudo e não pôde explicar a estruturação de *B. excelsa*. As subpopulações do Amazonas, por exemplo, são geneticamente mais distantes das subpopulações do Acre (pertencem à mesma sub-bacia), do que da subpopulação do Pará (separada pelo Rio Madeira).

Espécies arbóreas tropicais parecem apresentar um padrão de H_e e H_o elevados, valores baixos para estimativas de diferenciação populacional e baixa estruturação em micro-escala, que foi também observado nas subpopulações analisadas de *B. excelsa*. Apesar dessas semelhanças, em diferentes espécies são observadas diferentes características com relação ao sistema reprodutivo, síndromes de polinização e dispersão de sementes, longevidade, adaptação a condições ambientais, entre outros. Assim, mesmo padrões semelhantes podem ter diferentes causas. Para castanheira, a distância que separa cada par de subpopulações explicou grande parte da estruturação encontrada, porém a presença de rios de médio e grande porte separando as populações não parece ter influência sobre a estruturação, como foi observado em seringueiras.

É muito pouco provável que a estruturação genética de uma espécie tenha apenas uma causa. Em geral, um conjunto de fatores tem influência sobre as populações, inclusive fatores que atuaram em diferentes períodos e escalas de tempo. A análise do dendrograma obtido a partir das distâncias genéticas sugere que o rio Amazonas possa ser uma barreira ao fluxo gênico (Figura 10), apesar da amostragem feita no presente trabalho não permitir testar essa hipótese.

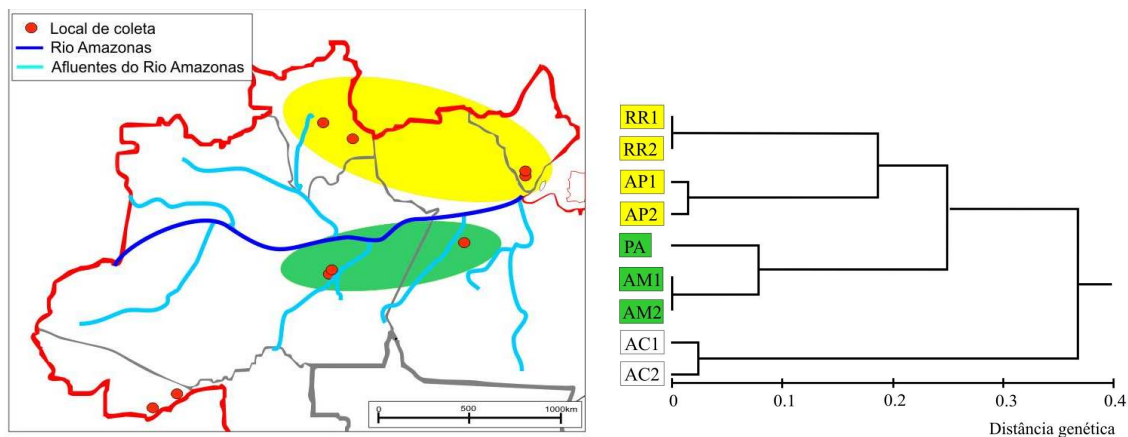


Figura 10. Mapa com subpopulações de Roraima e do Amapá e subpopulações do Amazonas e do Pará agrupadas (esquerda) de acordo com dendrograma gerado a partir das distância genéticas estimadas (direita).

As diferenças observadas na diversidade genética entre subpopulações de estados diferentes podem ser um indicativo de retração e expansão populacional. A teoria do

refúgio de Haffer (1969) e Vanzolini e Williams (1970) não é totalmente aceita, mas têm sido encontradas evidências em diversos grupos de organismos que indicam a possibilidade de diferentes efeitos das mudanças climáticas do Pleistoceno em diferentes locais. São encontradas, por exemplo, áreas de endemismo de borboletas, aves ou plantas em vários pontos da Amazônia, com a sobreposição de áreas de endemismo de dois ou mais grupos em alguns pontos (Figura 11). Essas áreas de endemismo são possíveis pontos de refúgios, locais onde ocorreu menor variação ambiental (Haffer; Prance, 2002). Assim, podem ter existido locais com menores flutuações populacionais e é esperado que esses apresentem populações com maior diversidade e maior número de alelos privados, assim como nos centro de origem das espécies (Alves *et al.*, 2007).

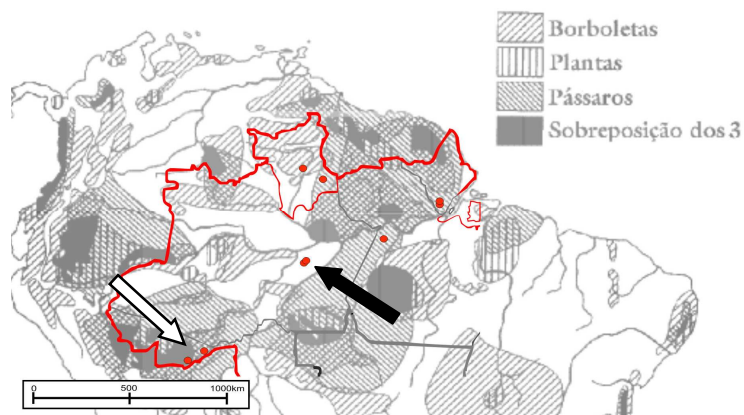


Figura 11. Áreas de endemismo de plantas, aves e borboletas na Amazônia e locais onde foram amostradas as subpopulações (Adaptado de Haffer; Prance, 2002).

As subpopulações do Acre (seta branca) foram as que apresentaram maior número de alelos total, maior número de alelos privados e estão localizadas muito próximas a um dos possíveis refúgios na Amazônia (Figura 11). Com menor diversidade e menor número de alelos privados estão as subpopulações do Amazonas (seta preta) localizadas em uma área que parece ter sido muito afetada por mudanças ambientais. Existem poucos estudos testando a teoria dos refúgios na Amazônia, especialmente para plantas. O desenho amostral deste trabalho também não permite fazer inferências a respeito dessa teoria, mas os resultados obtidos são um indicativo de que essa também seja uma hipótese a ser mais explorada.

Existem discussões a respeito do papel do homem na distribuição das castanheiras ao longo da Amazônia, como por exemplo, a hipótese de que índios pré-colombianos possam ter dispersado sementes de castanheira, fazendo plantações que hoje seriam identificados como castanhais (Clement *et al.*, 2010). Entretanto, a dispersão de sementes mais comum feita por cotias, somados a raros eventos de dispersão a maiores distâncias permitem que a atual distribuição das árvores no ambiente tenha ocorrido ao longo de muito tempo sem a interferência humana (Peres; Baider, 1997).

2.6 Conclusão

A grande proporção de heterozigotos observada na maior parte das subpopulações e a ausência de endogamia devido ao sistema de cruzamento reforçam a idéia de existência de mecanismos de auto-incompatibilidade na espécie. A manutenção da variabilidade genética é favorecida pelo sistema de cruzamento alógamo, o que deve ser levado em consideração no desenvolvimento de planos de conservação e manejo da espécie, para evitar déficits de fecundidade.

A grande capacidade de dispersão de pólen e sementes e a longevidade da castanheira são características que tornam possível a dispersão da espécie pela Amazônia sem necessidade de interferência humana. Entretanto, não é possível concluir que essa interferência não existiu a partir dos resultados de estruturação deste trabalho, permanecendo, assim, a ausência de um consenso a esse respeito.

A estrutura genética encontrada pode ser analisada considerando três escalas: (i) intrapopulacional; (ii) entre subpopulações separadas por distâncias moderadas (<500km); e (iii) entre subpopulações separadas por grandes distâncias. Em todas as escalas, foi encontrada correlação significativa entre a estruturação genética e a distância que separa os pares de indivíduos ou subpopulações.

Na maioria das subpopulações, os indivíduos mais próximos são mais aparentados. Essa estruturação pode ser causada tanto por limitação da dispersão de sementes, como de pólen. Entre subpopulações mais próximas, a estruturação parece ser causada pela limitação na dispersão de pólen, dependente da capacidade de voo das abelhas dispersoras. Em ambos os casos, a baixa estruturação pode ser influenciada pela longevidade da castanheira. Entre subpopulações muito distantes, o aumento da distância entre cada par tem efeito menos direto sobre a diferenciação populacional, mesmo com grandes variações na distância que as separa (500 a 2000km). Isso pode indicar que em macro-escalas, podem existir outros mecanismos envolvidos no desenho do padrão observado.

Referências Bibliográficas

- ALLOGIO, T. 30 anos da Floresta Nacional do Tapajós: avanços e retrocessos na busca da integração entre conservação ambiental e participação social. 2004.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.; GARCIA-BARRIOS, R.; LARA-MORENO, C., MARTINEZ-RAMOS, M. Demographic and genetic models in conservation biology applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.27, p. 387–421. 1996.
- ALVES, R.M.; SEBBEN, A.M.; ARTERO, A.S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 3, p. 289–298. 2007.
- AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. **Conservation Genetics: Case Histories from Nature**. New York: Chapman & Hall, 1996.
- AZEVEDO, V. C. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. Tese (doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2007.
- BALLOUX, F. Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution*, v. 58, n. 9, p.1891-1900. 2004.
- BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, n. 4, p. 573-582. 2009.
- BIZOUX, J.P.; DAÏNOU, K.; BOURLAND, N.; HARDY, O.J.; HEUERTZ, M.; MAHY, G.; DOUCET, J.L. Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree. **Molecular ecology**, v. 18, n. 21, p. 4398-408. 2009.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV. 2006.
- BRAGA, P.I.S. Subdivisão fitogeográfica, tipos de vegetação, conservação e inventário florístico da floresta Amazônica. **Suplemento - Acta Amazonica**, v.9, p.53-80. 1979.
- BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; SOUZA, Z.P. **Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites**. Circular técnica 20, Embrapa Cenargen, Brasília DF. 2003.
- CAMARGO, P.B.; SALOMÃO, R.P.; TRMBORE, S.; MARTINELLI, L.A. How old are large brazil-nut trees (*Bertholletia excelsa*) in the Amazon? **Scientia Agricola**, n. 51, v. 2, p. 389-391. 2004.

CAVALCANTE, M.C. **Visitantes florais e poliniação da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.&B.) em cultivo na Amazônia central**. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 2008.

CHAPUIS, M.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631. 2007.

CHEN, C.; DURAND, E.; FORBES, F.; FRANÇOIS, O. Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 5, p. 747-756. 2007.

CLEMENT, C.R.; CRISTO-ARAÚJO, M.D.; D'Eeckenbrugge, G.C.; PEREIRA, A.A.; Picanço-Rodrigues, D. Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. **Diversity**, v. 2, p.72-106. 2010.

COHENCA, D. Evolução anual do desmatamento na Floresta Nacional do Tapajós de 1997 a 2005. In: XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. INPE, **Anais**. Florianópolis, SC, 2007.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliensis*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular ecology**, v. 10, n. 2, p. 349-56. 2001.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, p.1585-1592. 1999.

DICK, C., HEUERTZ, M. The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. **Evolution**, v.62, p.2760–2774. 2008.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15. 1987.

ERICKSON, D.L.; HAMRICK, J.L.; KOCHERT, G.D. Ecological determinants of genetic diversity in an expanding population of the shrub *Myrica cerifera*. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1655-1664. 2004.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-20. 2005.

FERREIRA, L.; VENTICINQUE, E.; ALMEIDA, S. O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. **Estudos Avançados**, v.19, n.53, p.157–166. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3 ed. Brasília, DF: EMBRAPA. 1998.

FREELAND, J. **Molecular ecology**. Sussex: Wiley. 2005.

- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1995.
- GAMA, J.R.; SOUZA, A.L.; MARTINS, S.V.; SOUZA, D.R. Comparação entre florestas de várzea e de terra firme do Estado do Pará. **Revista Árvore**, v. 29, p. 607-616. 2005.
- GHALAMBOR, C. K.; HUEY, R. B.; MARTIN, P. R.; TEWKSBURY, J.J.; WANG, G. Are Mountain Passes Higher in the Tropics? Janzen's Hypothesis Revisited. **Integrative and Comparative Biology**, v. 46, n. 1, p. 5 – 17. 2006.
- GOUDET, J. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486. 1995.
- HADDAD, C.J.; BONELLI, M.F.; PRADO, O. Projeto castanha Iratapuru-Amapá. 2006.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, p. 131-137. 1969.
- HAFFER, J.; PRANCE, G. T. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. **Estudos Avançados**, v. 16, n. 46, p.175-206. 2002.
- HAMRICK, J. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, p. 1685–1693. 1982.
- HAMRICK, J.; GODT, M. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 351, p. 1291–1298. 1996.
- HANSSON, B.; WESTERBERG, L. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2467-2474. 2002.
- 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.
- HAUGAASEN, J. M.; HAUGAASEN, T.; PERES, C. A.; GRIBEL, R.; WEGGE, P. Seed dispersal of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) by scatter-hoarding rodents in a central Amazonian forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 26, n. 03, p. 251–262. 2010.
- HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 6, p. 65-67. 1979.
- HOLSINGER, K.E.; WEIR, B.S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . **Nature reviews Genetics**, v.10, n. 9, p.639-650. 2009.

HUFFORD, K. M.; HAMRICK, J. L. Viability selection at three early stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **Evolution**, v. 57, n. 3, p. 518-526. 2003.

IBGE/SIDRA. Extração vegetal. <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em 03 outubro 2010.

IUCN 2010. IUCN *Red List of Threatened Species*. Version 2010.3. www.iucnredlist.org. Acesso em 03 outubro 2010.

JANZEN, J.H. Why Mountain Passes are Higher in the Tropics. **The American Naturalist**, v. 101, n. 919, p. 233 – 249. 1967.

_____. Euglossine Bees as Long-Distance Pollinators of Tropical Plants. **Science**, v.171, n. 3967, p. 203-205. 1971.

KALISZ, S.; NASON, J.D.; HANZAWA, F.M.; TONSOR, S.J. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history, and selection. **Evolution**, v. 55, n. 8, p. 1560–1568. 2001.

KANASHIRO, M.; HARRIS, S.A.; SIMONS, A. RAPD Diversity in Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. And Bonpl., Lecythidaceae). **Silvae Genetica**, v. 46, n.4, p. 219-223. 1997.

LACERDA, A. E.; 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, n3, p.1034-1043. 2008.

LE GUEN, V.; DOARÉ, F.; WEBER, C.; SEGUIN, M. Genetic structure of amazonian populations of *Hevea brasiliensis* is shaped by hydrographical network and isolation by distance. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, n. 4, p. 673-683. 2009.

LEMES, M.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2875–2883. 2003.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data, 2001. Disponível em : <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, p. 1420-1425. 1995.

MACHADO, F.R.B.; VINSON, C.C.; SILVA, P.V.; CIAMPI, A. Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais. In: 53º Congresso nacional de Botânica. Ed. Sociedade Brasileira de Botânica, **Anais**. Recife, PE, 2002.

MAUÉS, M. M. **Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl., Lecythidaceae) in Eastern Amazonia.** In: P. KEVAN & V.L. Imperatriz Fonseca (eds) Pollinating Bees The Conservation Link Between Agriculture and Nature - Ministry of Environment / Brasilia. p. 245–254. 2002.

MEFFE, G. K.; CARROL, C. R. **Principles of Conservation Biology**, 1994. USA: Sinauer Ass. Inc.

MILLER, M. **Tools for population genetics analyses (TFPGA):** a Windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data (Software). Version 1.3, 1997. Disponível em: <<http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>>.

MORI, S.A. Biologia da polinização em Lecythidaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 1, p. 121-124. 1988.

MORI, S.A., PRANCE, G.T. Taxonomy, ecology and economic botany of the brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, v. 8, p.130-150. 1990.

MORITZ, A. Estudos biológicos da floração e frutificação da castanha-do-Brasil. **Documentos Embrapa/Cpatu, Belém**, v. 29, p. 1-78. 1984.

MÜLLER, C. H.; RODRIGUES, I. A.; MÜLLER, A. A.; MÜLLER, N. R. M. **Castanha-do-brasil: resultados de pesquisa**. Belém: EMBRAPA-CPATU. 1980.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p. 583-590. 1978.

O'MALLEY, D.M., BUCKLEY, D.P., PRANCE, G.T.; BAWA, K. S. Genetics of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, p. 929-932. 1988.

OSTRANDER, E.A.; JONG, P.M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 8, p.3419-23. 1992.

PERES, C.A.; BAIDER, C. Seed dispersal, spatial distribution and population structure of Brazilnut trees (*Bertholletia excelsa*) in southeastern Amazonia. **Journal of Tropical Ecology**, v.13, p. 595-616. 1997.

PERES, C. A.; BAIDER, C.; ZUIDEMA, P. A.; WADT, L.H.O.; KAINER, K.A.; GOMES-SILVA, D.A.P.; SALOMÃO, R.P.; SIMÕES, L.L.; FRANCIOSI, E.R.N.; VALVERDE, F.C.; GRIBEL, R.; SHEPARD JR. G.H.; KANASHIRO, M.;

COVENTRY, P.; YU, D.W.; WATKINSON, A.R.; FRECKLETON, R.P. Demographic Threats to the Sustainability of Brazil Nut Exploitation. **Science**, v. 302, n. 5653, p. 2112-2114. 2003.

PRIMACK, R. B. **A primer of Conservation Biology**, USA: Sinauer Ass. Inc. 1995.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, n. 2, p. 945-959. 2000.

RAFALSKI, J.A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M.; TINGEY, S.V. **Generating and using DNA markers in plants**. In: BIRREN, B. & LAI, E. (edes.) *Analysis of non mammalian genomes - a practical guide*. New York: Academic Press. p. 75-134. 1996.

REIS, A.; BRAGA, A.; LEMES, M.; GRIBEL, R.; COLLEVATTI, R. Development and characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.(Lecythidaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 3, p. 920-923. 2009.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. J. **Primer3 for general users and for biologist programmers**. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds Krawetz S, Misener S). Totowa, NJ: Humana Press, p. 365-386. 2000. Disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi>. Acesso em: 6 de out. 2004.

SALOMÃO, R. Densidade, estrutura e distribuição espacial de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. & B.) em dois platôs de floresta ombrófila densa na Amazônia setentrional brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 4, p. 11-25. 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2 ed. CSHL, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

SAMPAIO, A.J. A flora amazônica. **Revista Brasileira de Geografia**, v.4, n.2, p. 57-72. 1942.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v. 32, p. 1083-1090. 2002.

SCHLÖTTERER, C. The Evolution of Molecular Markers – Just a Matter of Fashion? **Nature Reviews**, v. 5, p. 63-69. 2004.

SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA, E.; NOGUEIRA, R.C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) utilizando marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Ppymorphic DNA). **Magistra**, v. 18, n. 1, p. 42-47. 2006.

SHANLEY, P.; G. MEDINA. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. CIFOR, Imazon, Belém. 2005.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numeral taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado**. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2009.

TADAIESKY, N.; REBELO, A.; VITOR, G. Análise dos impactos ambientais provocados pelo turismo nos municípios de Bragança, Maracanã (Vila de Algodão) e Salinópolis. In: Seminário Internacional de Turismo Sustentável, 2, 2008, Fortaleza, CE. **Anais**, Fortaleza. 2008.

TÓTH, G. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981. 2000.

VANDERGAST, A.G.; BOHONAK, A.J.; WIESSMAN, D.B.; FISHER, R. N. Understanding the genetic effects of recent habitat fragmentation in the context of evolutionary history: phylogeography and landscape genetics of a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmidae: Stenopelmatus). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 977-992. 2007.

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.

VANZOLINI, P. E.; WILLIAMS, E. E. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia (São Paulo)**, v. 19, p. 1-298. 1970.

VERON, V.; CARON, H.; DEGEN, B. Gene flow and mating system of the tropical tree *Sextonia rubra*. **Silvae Genetica**, v. 54, n. 6, p. 275-280. 2005

VIEIRA, A.H.; BENTES-GAMA, M.M.; OLIVEIRA, A.C.; ROCHA, R.B. Contribuições sobre fenologia da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em Porto Velho, Rondônia. In: Congresso de Ecologia do Brasil, 8, 2007, Caxambu –MG. **Anais**, Caxambu, 2007.

WADT, L.H.O.; KAINER, K.A.; GOMES-SILVA, D.A.P. Population structure and nut yield of *Bertholletia excelsa* stand in southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 211, p. 371-384. 2005.

WALTER, R.; EPPERSON, B.K. Analysis of spatial structure among seedlings in populations of *Pinus strobus* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, v.91, p.549-557. 2004.

WAPLES, R.S.; GAGGIOTTI, O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular ecology**, v. 15, p. 1419-1439. 2006.

WEIR, B.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358–1370. 1984.

WRIGHT, S. Breeding structure of populations in relation to speciation. **American Naturalist**, v. 74, p.232-248. 1940.