

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Estrutura Genética Molecular de uma Coleção de Germoplasma *in vivo* e *ex situ* de
Dipteryx alata Vog.**

REJANE ARAÚJO GUIMARÃES

Goiânia
2014

REJANE ARAÚJO GUIMARÃES

**Estrutura Genética Molecular de uma Coleção de Germoplasma *in vivo* e *ex situ* de
Dipteryx alata Vog.**

Dissertação apresentado à coordenação do programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Goiás, como exigência parcial para obtenção de título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Thannya Nascimento Soares

Co-orientador:

Prof. Dr. Lázaro José Chaves

Goiânia

2014

“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar, é aproximar-se de Deus”. Pitágoras

DEDICO

Aos meus Pais, Venerando e Isabel e a minha querida Avó, Derciolina, pelo amor incondicional e compreensão da importância dessa conquista.

Ao meu namorado Giuliano pelo incentivo, companheirismo e pelos momentos de felicidade.

As amigas: Kássia Marques e Warita Alves, pelo apoio e companheirismo sem medida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Criador, pelo dom da vida! Vida que nos proporcionou a oportunidade de conhecer a obra de sua criação: *“formou, pois, o homem do barro da terra, e inspirou-lhe nas narinas um sopro de vida.... fez brotar da terra toda sorte de árvores, de aspecto agradável, e de frutos bons para comer”* (Gn. 2,7.9)

A minha família, pelo incentivo, apoio, amor incondicional, carinho, palavras de conforto e paciência nos momentos difíceis. Obrigada por terem me ensinado que a fé, humildade, honestidade e força de vontade fazem com que sonhos possam se tornar realidade!!!

Ao meu querido Giuliano por tudo de bom que representa na minha vida, pelo apoio, por acreditar sempre em mim e fazer dos poucos momentos juntos, simplesmente inesquecíveis!!!

As amigas, Kássia Marques e Warita Alves por estarem comigo cada momento, por me acolher nos momentos de desespero, por mostrar a todo instante que eu não estava sozinha!!! Por fim por fazerem parte desse momento tão importante.

A minha orientadora Dra. Thannya Nascimento Soares pela disponibilidade, dedicação, atenção, paciência, apoio e companheirismo. Por sempre acreditar no meu potencial e no trabalho que realizo; por sempre buscar soluções e transmitir tranquilidade nos momentos em que surgiram obstáculos, pelos ensinamentos e sábios conselhos não só profissionais, mas também pessoais, o meu MUITO OBRIGADA!!!

Ao meu co-orientadora Dr. Lázaro José Chaves, pela apoio, paciência em me tirar dúvidas, pelas correções, por me dar a oportunidade de fazer parte do seu projeto ao qual sou muito grata.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar e contribuir com o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética & Biodiversidade da UFG pelo espaço e material de trabalho, mas principalmente pelas pessoas com as quais pude conviver. Cada aluno, professor e técnico que deixou grande aprendizado; pelas amizades construídas, pela convivência proporcionada por muitos que ali trabalham. Obrigada, a vocês, que

compartilharam momentos de descontração, pelas risadas e lágrimas, carinho; e em especial pela força.

Ao Laboratório de Melhoramento de Plantas, da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, na pessoa do Professor Dr. Alexandre S. G. Coelho, pelo apoio e ajuda e principalmente pela concessão do uso ao sequenciador, que possibilitou realizar genotipagem dos indivíduos da coleção de germoplasma de baru;

Agradeço às empresas que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio financeiro ao projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através do GENPAC10 (Projeto CNPq – Processo: 563624/2010-8 e Projeto FAPEG - Chamada: 031/2010 - Processo: 201110267000132). O PRONEX - Programas de Apoio a Núcleos de Excelência – o projeto FAPEG (Chamada 07/2009 - Processo: 200910267000458). E ao Projeto Baru coordenado pelo Professor Lázaro (Edital Universal- CNPq N ° 14/2011 - Processo 476830/2011-7).

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

Ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética e Biologia Molecular, da UFG, pelo suporte na realização deste trabalho;

A todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, a estes minha eterna gratidão e reconhecimento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específico.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Recursos genéticos vegetais.....	14
3.2 Conservação <i>in situ</i> e <i>ex situ</i>	15
3.3 Coleção de germoplasma.....	15
3.4 <i>Dipteryx alata</i>	17
3.5 Diversidade e estrutura genética.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Coleção de germoplasma e coleta do material biológico.....	25
4.2 Dados moleculares.....	28
4.3 Análises estatísticas.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	39
7. REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locais de montagem de experimentos para estudo da espécie *Dipteryx alata* Vog, com o respectivo ano de implantação e local de coleta do germoplasma, a quantidade de matrizes e progênies selecionadas em diferentes trabalhos realizados para conservação *ex situ* da espécie..... 17

Tabela 2. Localidades e coordenadas geográficas das 25 subpopulações de *D. alata* Vog, amostradas no Cerrado.....28

Tabela 3. Relação dos marcadores microssatélites de *D. alata*, separados por conjunto de multiplex, incluindo as sequências dos *primers* e a fluorescência (*forward*) e (*reverse*), motivos de repetição da região microssatélite (MR) e temperatura de anelamento (TA).....30

Tabela 4. Parâmetros de variabilidade genética para nove locos microssatélites analisados em *Dipteryx alata*. Em que *n* é o número de indivíduos por loco, *A*, numero de alelos por loco, *He* é a heterozigosidade esperada e *Ho* heterozigosidade observada nas 25 subpopulações naturais.....33

Tabela 5. Estimativas de parâmetros de variabilidade genética subpopulacional estimados com base em nove locos microssatélites, avaliados em 25 subpopulações de *Dipteryx alata*, sendo que *N*: número de plantas analisadas, *P*: porcentagem de locos polimórficos, *A*: número médio de alelos, *He*: heterozigosidade esperada, *Ho*: heterozigosidade observada, *f_i*: índice de fixação intrapopulacional. 36

Tabela 6. Avaliação comparativa entre diferentes estudos conduzidos com *D. alata* utilizando de marcadores microssatélites, sendo que *N*: número de plantas analisadas, *A*: número médio de alelos, *He*: heterozigosidade esperada, *Ho*: heterozigosidade observada, *f_i*: índice de fixação intrapopulacional.....37

Tabela 7. Análise de variância de frequências alélicas hierárquica, segundo Weir (1990), sendo que *f_i*: índice de fixação intrapopulacional, *F*: índice de fixação total, *θ_s*: índice de fixação entre progênies dentro de subpopulações, *θ_p*: índice de fixação entre subpopulações, para cada um dos locos, utilizando um intervalo de confiança a 95% para os valores totais foram obtidos através do procedimento de bootstrap sobre os locos, utilizando 1000 reamostragens..... 37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) O barueiro apresenta copa alongada ou larga, de 6 a 15 m de diâmetro. (Fonte: Lázaro José Chaves, 2011) (B) Flor com aproximadamente 8mm de comprimento, com mancha carmim. (Fonte: www.centraldocerrado.org.br.) (C) O fruto possui cerca de 4 a 5 cm de comprimento, marron-claro, ovóide e pericarpo lenhoso. (Fonte: Lázaro José Chaves, 2011) (D) As sementes ocorrem uma por fruto, são elipsoides, e apresentam de 2 a 2,5 cm de comprimento de coloração marrom-clara. (Fonte: Lorenzi, 2002) (E e F) A madeira pode ser caracterizada como densa a muito densa, com alta resistência, possui tronco com ritidoma de cor amarelada com estrias transversais e depressões (Fonte: Lorenzi, 2002).....18

Figura 2. Frutos maduros encontrados no barueiro (Fonte: Lázaro José Chaves, 2011).....19

Figura 3. A presença da abelha *Apis mellifera* em visita à flor de baru promovendo a polinização (Fonte: Oliveira & Sigrist 2008).....20

Figura 4. (A) A Coleta de frutos de baru, para fins alimentares, artesanais, entre outros (Fonte: Carrazza, 2010). (B) A presença do baru nas pastagens beneficia o gado em razão de fornecer abrigo (Fonte: Lázaro José Chaves, 2011).....21

Figura 5. Mapa indicando 25 localidades de coleta no cerrado da espécie *D. alata* que compõe a coleção de germoplasma da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG. A coloração cinza representa a área de abrangência do bioma.....26

Figura 6. (A) Frutos de baru (*Dipteryx alata*) amostrados em sacos telados, indicando a matriz e o local de coleta. (B) Germinação dos frutos em casa de vegetação localizada na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG). (C) Coleção de germoplasma de *D. alata*, mantida *in vivo* em uma estação experimental pela (EA/UFG). (D) Plântulas de baru, antes de ser encaminhadas para coleção.....26

Figura 7. Distribuição das frequências alélicas nos locos DaE12 (A), DaE20 (B), DaE67(C), DaE06 (D).....33

Figura 8. Distribuição das frequências alélicas nos locos DaE34 (A), DaE41 (B), DaE46 (C), DaE63 (D), Bm164 (E).....34

RESUMO

GUIMARÃES, R. A. **Estrutura Genética Molecular de uma Coleção de Germoplasma *in vivo* e *ex situ* de *Dipteryx alata* Vog.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

Os padrões de distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações são importantes a fim de conhecer a atuação dos processos evolutivos, para a adoção de estratégias eficazes de conservação e uso de recursos genéticos vegetais. A estrutura genética populacional está relacionada com a forma como a variabilidade genética está distribuída dentro e entre as subpopulações. Os marcadores microssatélites são especialmente úteis para tais análises por serem altamente informativos. O Baru (*Dipteryx alata* Vogel), pertence à família Fabaceae e apresenta ampla distribuição no bioma Cerrado e um grande potencial para o uso na culinária local, ornamental e medicinal, sendo um importante recurso genético vegetal. Este estudo teve como objetivo avaliar a estrutura genética entre subpopulações de *D. alata* que constituem uma coleção de germoplasma, mantida pela Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. A coleção consiste de 600 indivíduos de 150 progênies de 25 subpopulações provenientes de diferentes regiões do bioma Cerrado. Foram utilizados nove pares de *primers*, oito desenvolvidos para a espécie *D. alata* e um desenvolvido e transferido de *Phaseolus vulgaris* para a análise molecular. Foram observados entre 2 e 14 alelos, com média de 5,5 alelo por loco. O valor médio de heterozigosidade observada foi igual a 0,340 e variou de 0,102 (DaE06) a 0,711 (DaE41). A heterozigosidade esperada, sob a condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi igual a 0,383, variando entre 0,162 (DaE06) e 0,809 (DaE41). A análise de estrutura genética populacional apresentou um nível de parentesco médio entre indivíduos de uma mesma progênie (θ_s) de 0,169, o que equivale ao parentesco esperado para uma mistura de meio-irmãos e irmãos completos. A partir do valor de θ_s , pode-se concluir que há uma alta diferenciação genética entre as progênies. Quando avaliadas as subpopulações, foi encontrado um valor estimado de θ_p igual a 0,097, sugerindo que existe uma moderada estruturação genética. O valor do índice de fixação intrapopulacional global ($f=0,122$) indicou a presença de baixa endogamia nas subpopulações que compõem a coleção de germoplasma. A estimativa da taxa de fecundação cruzada aparente (t_a) teve valor igual a 0,78. O valor global de F foi significativo e igual a 0,27. A análise de estrutura genética populacional revelou presença de estruturação genética entre subpopulações e entre progênies dentro de subpopulações. Isso revela que a coleção de germoplasma de baru apresenta diversidade genética entre e dentro de populações, indicando que as estratégias de conservação devem considerar os dois níveis.

Palavras-chave: Baru, Cerrado, Diversidade Genética, Microssatélites, Recursos Genéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares. ICB-UFG.

Co-orientador: Prof. Dr. Lázaro José Chaves. EA-UFG.

ABSTRACT

GUIMARÃES, R. A. **Molecular Genetic Structure of a Germplasm Collection of in vivo and ex situ *Dipteryx alata* Vog.** Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology), Instituto de Ciências Biológicas –ICB, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

The distribution patterns of genetic variability within and among subpopulations are important to know the performance of evolutionary processes, to adopt effective conservation strategies and to use genetic plant resources. The population genetic structure is focused on how the genetic variability is distributed within and between subpopulations. Microsatellite markers are especially useful for such analyzes because are highly informative. The Baru (*Dipteryx alata* Vogel), belongs to the Fabaceae family and is widely distributed in the Cerrado biome, also has a great potential for use in local cooking, as ornamental plant and in popular medicine, so being an important genetic resource plant. This study aimed to evaluate the genetic structure among subpopulations of *D. alata* which constitute a germplasm collection, maintained by the Escola de Agronomia, of the Universidade Federal de Goiás. The collection consists of 600 individuals from 150 progenies of 25 subpopulations from different regions of Cerrado biome. Nine pairs of primers were used, eight developed for the species *D. alata* and one developed and transferred from *Phaseolus vulgaris* for molecular analysis. The number of alleles ranged from 2 to 14 alleles, with an average of 5.5 allele per locus. The average of observed heterozygosity was equal to 0.340 and ranged from 0.102 (DaE06) to 0.711 (DaE41). The expected heterozygosity, under the condition of Hardy-Weinberg equilibrium was equal to 0.383, ranging from 0.162 (DaE06) and 0.809 (DaE41). The analysis of population genetic structure showed a level of medium relatedness between individuals of the same progeny (θ_s) of 0.169, which is equivalent to that kinship expected for a mixture of half-sibs and full sibs. From the value θ_s , it can be concluded that there is a high genetic differentiation between the progenies. When evaluated the subpopulations was found an estimated θ_p equal to 0.097, suggesting that there is a moderate genetic structure. The value of overall intrapopulation fixation index ($f=0.122$) indicated the presence of low inbreeding in subpopulations that composes the collection of germplasm. The estimated apparent outcrossing rate (t_a) value was equal to 0.78. The overall F value was significant and equal to 0.27. The analysis of population genetic structure revealed the presence of genetic structure among subpopulations and among progenies within of the subpopulations. This reveals that the germplasm collection of *D. alata* presents genetic diversity within and among populations, indicating that the conservation strategies should consider both levels.

Keywords: Baru, Cerrado, Genetics, Microsatellite Diversity and Genetic Resources.

Adviser: Prof.^a Dra. Thannya Nascimento Soares. ICB-UFG.

Co-adviser: Prof. Dr. Lázaro José Chaves. EA-UFG.

1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos abrangem uma gama de espécies de plantas, animais e microrganismos, sendo definidos como uma porção da biodiversidade que possui uma grande potencial socioeconômico. Assim os recursos genéticos acoplam a variabilidade das espécies de interesse e potencial econômico atual. Dentre os recursos genéticos, destacam os recursos genéticos vegetais, que visam assegurar a conservação da variabilidade genética de uma espécie vegetal de interesse (Valois, 1996).

A conservação desta variabilidade genética pode ocorrer de diferentes formas, como por exemplo *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* objetiva conservar o máximo de alelos possíveis, sendo que está realizada no hábitat natural da espécie. Outra forma de conservação é a *ex situ* que realiza a conservação da diversidade fora do hábitat natural (IBPGR, 1991; Brasil, 1994; Karp et al., 1997; Valois et al., 2001; Scariot & Sevilha, 2007).

A conservação *ex situ* pode ser realizada através de coleções de germoplasma. Assim a eficiência do programa de conservação depende de uma gama de fatores, tais como, coleta, caracterização e avaliação destas coleções. Os indivíduos devem ser caracterizados e avaliados, possibilitando estimar a diversidade genética presente na coleção. Essa caracterização pode ser realizada a partir de caracteres morfo-agronômicos, citológicos, bioquímicos, fisiológicos ou moleculares (Valois et al., 2001).

Na caracterização molecular, os marcadores microssatélites se apresentam como ferramentas eficientes na averiguação de parâmetros genéticos, que permitem diferenciar indivíduos e populações. A análise da diversidade genética pode ajudar a classificar corretamente um indivíduo, identificar duplicatas, auxiliar na quantificação do nível de variabilidade presente em um pool gênico, bem como a quantidade de variabilidade nas espécies ao longo do tempo (Chang, 2007).

O estudo da variabilidade tem por finalidade conhecer as relações genéticas, quantificar ou prever o nível de variabilidade total existente e a sua distribuição entre e dentro de populações. Este conhecimento proporciona importantes contribuições ao melhoramento genético e a manutenção e conservação de coleções de germoplasma (Bueno et al., 2001). Assim uma grande variedade de recursos genéticos é conservada, apresentando um enorme valor socioeconômico para o país (Goedert & Wetzel, 1999).

Almeida et al., (1987), destacando-se a importância das frutas nativas da região Centro-Oeste, com grande ênfase para o pequi, o buriti, o araticum e o baru.

A espécie *Dipteryx alata*, conhecida popularmente como baru, pertence à família Fabaceae, apresenta uma ampla distribuição no Cerrado brasileiro, sua ocorrência pode estar associada a condições de maior fertilidade do solo. Além disso, o baru destaca-se como espécie importante para este bioma, pois amadurece o fruto na estação seca, alimentando várias espécies da fauna (Corrêa, 1984; Almeida et al., 1998; Sano et al., 2004).

O potencial de utilização do baru é bastante amplo, aproveita-se desde a folha à raiz, sendo empregado como produto alimentar, madeireiro, forrageiro, industrial e na medicina popular (Almeida et al., 1998). Este é também usado na recuperação de áreas degradadas, pois apresenta alta produção de massa foliar, o que favorece o enriquecimento de nutrientes no solo. Mesmo com sua extrema importância econômica e ecológica, grandes populações desta espécie foram destruídas e continuam sendo perdidas em ecossistemas nativos (Carvalho, 2003; Pott & Pott, 2003; Sano et al., 2004). Assim estudos de pré-melhoramento e conservação da variabilidade genética tornam-se necessários, a fim de garantir o uso adequado desse recurso genético, bem como auxiliar no controle da estabilidade genética na coleção de germoplasma para subsidiar estratégias eficientes de manutenção e manejo (Faleiro, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

2.1.1 Avaliar a estrutura genética entre subpopulações de *D. alata*, que constituem a coleção de germoplasma mantida *in vivo* e *ex situ* pela Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG), utilizando marcadores microssátelites.

2.1.1 Específicos:

2.1.2 Verificar a magnitude da variabilidade genética molecular presente na coleção de germoplasma;

2.1.3 Avaliar a distribuição da variabilidade genética presente entre subpopulações e progênies dentro de subpopulações da coleção de germoplasma.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Conservação de Recursos Genéticos Vegetais

Os recursos genéticos abrangem uma gama de espécies de plantas, animais e microrganismos com grande potencial socioeconômico (Brown, 2007)b, sendo definido como uma porção da biodiversidade que possui uma grande importância para o homem, contribuindo para o seu desenvolvimento sustentável. Os recursos genéticos vegetais representam a biodiversidade da flora, a qual possui extrema importância, podendo ser considerados um reservatório genético da variabilidade genética interespecífica e intraespecífica (Valois, 1996; Goedert et al., 2007).

Considerando a importância da biodiversidade e dos recursos genéticos vegetais surge a preocupação com a conservação da sua variabilidade genética, com o objetivo de preservar uma espécie de interesse (Goedert et al., 2007). O desenvolvimento de ações que promovam a conservação e uso dos recursos genéticos vegetais deve ser algo planejado e uma das maneiras é a criação de programas de conservação, dando suporte as pesquisas que objetivam a conservação dos recursos genéticos (Goedert & Wetzel, 2007).

Desde a década de 70, a conservação dos recursos genéticos vegetais vem se tornando cada vez mais importante para comunidade científica internacional, onde foi criado o International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) que objetiva promover e coordenar trabalhos sobre recursos genéticos vegetais a nível mundial. No entanto, em 1992 houve uma mudança nos objetivos do IBPGR que passou a ser chamado de International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) visando à conservação e o uso dos recursos genéticos vegetais em benefício das gerações atuais e futuras (Brown, 2007)b.

O Brasil possui cerca de 20% a 25% de toda a biodiversidade existente no planeta, sendo o país mais rico em diversidade biológica do mundo (Vilela-morales & Valois 2000). Mesmo com toda essa riqueza, não pode ser considerado auto-suficiente em recursos genéticos vegetais, havendo a necessidade de fazer intercâmbio destes recursos com outros países. Isto visa assegurar uma ampla diversidade de espécies para a agricultura, garantindo a disponibilidade de alimentos (Giacomerti, 2007).

No Bioma Cerrado apresenta uma grande diversidade de recursos genéticos, dentre estes estão as espécies nativas dos cerrados, em que se destacam as espécies, araticum,

cagaita, jatobá, pequi, buriti, e o baru. O Baru é um recurso genético importante para comunidades locais, devido ao seu amplo potencial de utilização, tais como: alimentar, madeireiro, forrageiro, industrial e medicinal.

3.2 Conservação *in situ* e *ex situ*

Há diferentes estratégias de conservação de uma espécie, como exemplo a conservação *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* consiste na preservação realizada no habitat natural da espécie. Este modo de conservação é comum em reservas biológicas e parques nacionais, visando conservar a biodiversidade. No entanto não é permitida a exploração de recursos naturais nestas áreas (Scariot & Sevilha, 2007).

Uma forma de conservação *in situ* é a conservação *on farm*, sendo esta considerada uma forma direta de conservação (Brown, 2000a). Este modo de conservação está relacionado à conservação de espécies cultivadas, ocorrendo de acordo com os interesses agrícolas. Assim realiza-se a conservação de variedades primitivas, crioulas e melhoradas, podendo ser mantidas por agricultores, através de um sistema de cultivo agrícola, hortícola ou agroflorestal tradicional. Uma particularidade da conservação *on farm* em relação à conservação de reservas naturais, é que esta permite o manejo das espécies de interesse (Clement et al., 2007).

A conservação *ex situ* é um tipo de conservação que ocorre fora do habitat natural da espécie. Este método de conservação objetiva manter a máxima integridade genética e biológica de uma espécie, preservando assim sua variabilidade genética (Brasil, 1994; Karp et al., 1997; Valois et al., 2001, Santos & Salomão, 2007). Na maioria das vezes a realização da conservação *ex situ* é motivada pelas ações antrópicas que acarretou destruições de habitats naturais. Isto tem ocorrido em diversos biomas como o Cerrado, em que várias espécies de uso potencial são utilizadas de forma indevida (Giacometti & Wetzell, 2007) (Tabela 1).

3.3 Coleções de germoplasma

As coleções de germoplasma são estruturas físicas que mantêm o germoplasma, sendo este uma fonte de variabilidade genética. Assim essas coleções visam manter a

variabilidade genética de uma espécie, pois uma vez perdida, representa a diminuição de informações potencialmente valiosas, as quais permitem aumentar o conhecimento a cerca de uma espécie (Valois et al., 2001).

No Mundo, cerca de 6,1 milhões de indivíduos são conservados e dispostos em 1.320 coleções de germoplasma (Vasconcelos et al., 2007). Essas coleções são mantidas por instituições que objetivam garantir a conservação da variabilidade genética destas espécies. Com o intuito de utilizá-las futuramente, como por exemplo, em programas de melhoramento. Entretanto, apesar dessa disponibilidade, acredita-se que apenas 4% de todos os indivíduos do mundo são utilizados, tal fato é decorrência da falta de documentação, descrição e avaliação adequada dos indivíduos (Vasconcelos et al., 2007).

No Brasil existem aproximadamente 160 coleções de germoplasma em conservação *ex situ* (Scariot & Servilha, 2007). Algumas universidades brasileiras, tais como Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e Universidade Federal de Viçosa (UFV) criaram coleções interessantes na conservação de espécies cultivadas e nativas (Freitas, 2006). O IAC é um exemplo, que realiza ações de pesquisa em recursos genéticos com ênfase em coleções de germoplasma de café e citros. Outra rede de ensino é a UFV que com o apoio da Fundação Rockefeller, criou no ano de 1966 a coleção de Germoplasma de Hortaliças (BGH – UFV) (Ferreira et al., 2005).

A maioria das coleções de germoplasma está integrada ao principal programa de conservação *ex situ* do país, pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) chamado de Conservação e Uso dos Recursos Genéticos. Este programa tem como objetivo geral o enriquecimento, a caracterização e a documentação da coleção de germoplasma dos recursos genéticos (Goedert & Wetzel, 1999).

Na Região centro-oeste do Brasil, tem-se a Embrapa Cerrados conduz trabalhos com frutíferas nativas (Franzon, 2009). Além da Embrapa, a Universidade Federal de Goiás destaca-se na criação e manutenção de coleções de germoplasma de frutíferas nativas como: cagaita (*Eugenia dysenterica*), mangaba (*Hancornia speciosa*), cajú-do-cerrado (*Anacardium othonianum*), baru (*Dipteryx alata*), entre outras.

Há registro de experimentos para implantação de coleções de Baru. O primeiro experimento para estudo da espécie *Dipteryx alata* Vog, com teste de progênies e procedências localiza-se no campo experimental do Instituto Florestal do Estado de São Paulo (Siqueira et al., 1993) com plantas adultas. Na fase jovem, três outras instituições

possuem amostras menores, na Embrapa Cerrados, Distrito Federal (Sano et al., 1994), na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais (Oliveira, 1998) e na Universidade Federal de Goiás, GO (Tabela1).

Tabela 1. Locais de montagem de experimentos para estudo da espécie *Dipteryx alata* Vog, com o respectivo ano de implantação e local de coleta do germoplasma, a quantidade de matrizes e progênies selecionadas em diferentes trabalhos realizados para conservação *ex situ* da espécie.

Local	Referências	Ano de Implantação	Local de coleta	Nº Matrizes	Nº Progênies
Pederneiras,SP	Siqueira et., 1993	1980	MS	25	22
			MS	16	16
			DF	25	17
Pederneiras,SP	Siqueira et., 1993	1986	MS	17	26
		1987	SP	25	25
Planaltina,DF	Sano et al.,1994	1991	GO	5	20
			MG	2	20
Brasilândia,MG	Oliveira, 1998	1996	MG	25	20
				25	20
				16	20
Goiânia, GO	Mota, 2013	2013	GO, TO, MT, MS, MG e SP.	150	150

3.4 *Dipteryx alata*

A espécie *Dipteryx alata* Vogel pertence à família Fabaceae, apresenta vários nomes populares, variando conforme a região, sendo o mais comum baru, mas também é conhecida como barujó, cumbary, meriparagé, castanha-de-ferro, cumbaru, cumaru, cumarurana, emburena-brava, coco-feijão, pau-cumaru (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 2002).

No Brasil apresenta uma ampla distribuição (Almeida et al., 1998; Carvalho, 2003; Pott & Pott, 2003; Sano et al., 2004; Silva-Júnior, 2005), ocorrendo nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Tocantins, Amazonas, Para, Piauí, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Distrito Federal. Sendo também encontrada na Bolívia, Paraguai e Peru (Lorenzi, 1992; Almeida et al., 1998; Botezelli et al., 2000). Possuindo distribuição irregular, podendo ocorrer em grandes agrupamentos homogêneos ou ausência quase total em outras áreas (Corrêa, 1984; Almeida et al., 1998; Sano et al., 2004).

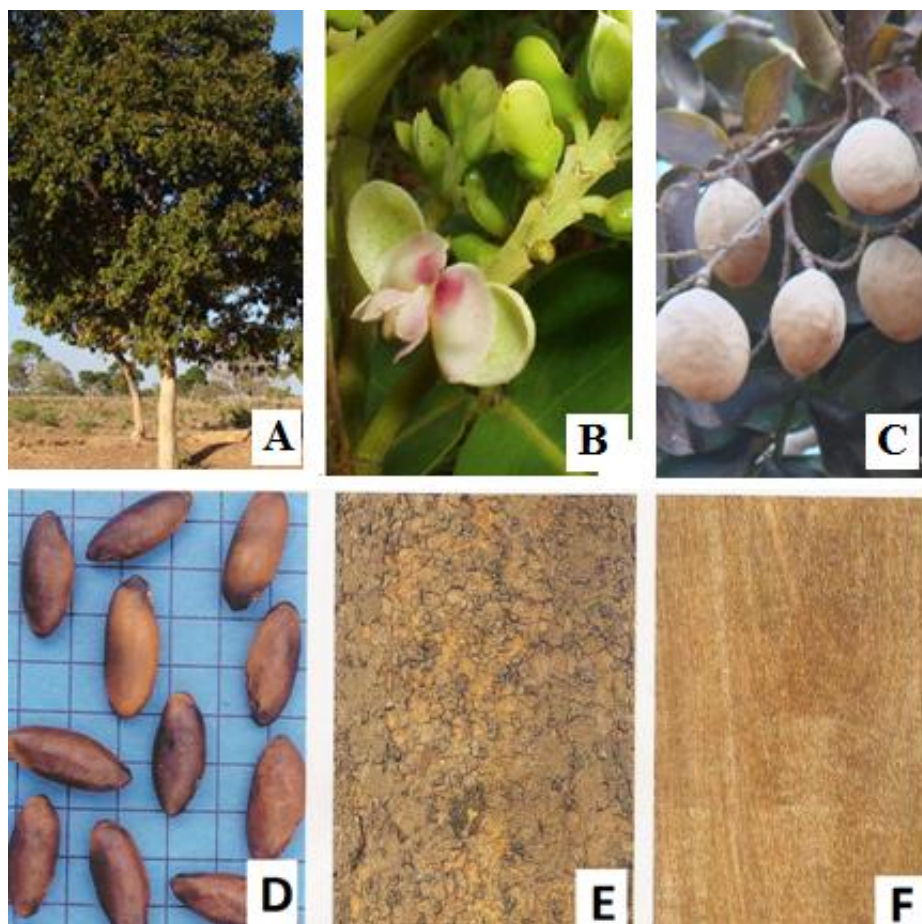


Figura 1. (A) O barueiro apresenta copa alongada ou larga, de 6 a 15 m de diâmetro. (Fonte: Lázaro José Chaves, 2011) (B) Flor com aproximadamente 8mm de comprimento, com mancha carmim. (Fonte: www.centraldocerrado.org.br.) (C) O fruto possui cerca de 4 a 5 cm de comprimento, marron-claro, ovóide e pericarpo lenhoso. (Fonte: Lázaro José Chaves, 2011) (D) As sementes ocorrem uma por fruto, são elipsoides, e apresentam de 2 a 2,5 cm de comprimento de coloração marrom-clara. (Fonte: Lorenzi, 2002) (E e F) A madeira pode ser caracterizada como densa a muito densa, com alta resistência, possui tronco com ritidoma de cor amarelada com estrias transversais e depressões (Fonte: Lorenzi, 2002).

D. alata pode ser encontrada em formações de Cerrado sentido restrito, cerradão mesotrófico, ocorrendo também em matas secas e no Pantanal Mato-Grossense (Almeida et al., 1998; Carvalho, 2003; Pott & Pott, 2003; Silva-Júnior, 2005), evidenciando uma adaptação a diferentes condições de luminosidade. A sua ocorrência pode estar associada a solos mais férteis, sendo assim ocorre naturalmente em solos de fertilidade química médios, bem drenados, tendo preferência por solos areno-argilosos (Almeida et al., 1998; Carvalho, 2003; Sano et al., 2004).

O barueiro pode alcançar até 20 m de altura com 70 cm diâmetro, apresenta copa alongada ou larga, de 6 a 15 m de diâmetro. Possui tronco com ritidoma de cor amarelada

com estrias transversais e depressões, sua madeira pode ser caracterizada como densa a muito densa, com alta resistência ao ataque de organismos xilófagos (Almeida et al., 1998; Carvalho, 2003; Sano et al., 2004).

A espécie *D. alata* é alógama e autocompatível, porém apresentam mecanismos para evitar ou reduzir a autopolinização espontânea como a presença de película estigmática que impede a germinação do pólen (Oliveira & Sigrist, 2008). As flores são hermafroditas, apresentando aproximadamente 8mm de comprimento, a inflorescência é do tipo panícula (Almeida et al., 1998). As folhas são compostas, possuindo de 7 a 12 folíolos, alternados, subsésseis ou com peciólulo de até 2mm de comprimento (Silva-Júnior, 2005; Almeida et al., 1998). O fruto possui cerca de 4 a 5 cm de comprimento, contendo apenas uma semente que possui 2 a 2,5 cm de comprimento de coloração marrom-clara (Almeida et al., 1998) (Figura 1 e 2).

A espécie apresenta floração e frutificação durante a estação chuvosa e dispersão das diásporas na estação seca subsequente. Sendo assim, a floração ocorre de novembro a fevereiro e a frutificação, de janeiro a março, encontrando frutos novos, pois os frutos maduros são encontrados de julho a outubro. A renovação de folhas, quando ocorre, é tardia durante a estação seca de julho a setembro, pode ser atribuída à restrição hídrica ou ainda uma estratégia evolutiva para fuga de herbívoros (Almeida et al., 1998; Bulhão & Figueiredo 2002; Silva-Júnior, 2005).

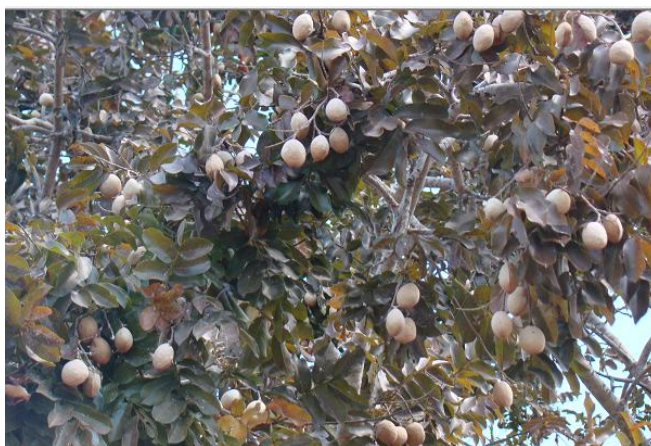


Figura 2. Frutos maduros encontrados no barueiro (Fonte: Lázaro José Chaves, 2011).

A produção de frutos é irregular, pois após uma intensa frutificação em um determinado ano, a próxima frutificação pode não ter uma boa produção de frutos. A

dispersão dos frutos se dá em plena estação da seca, no período de setembro a outubro quando as sementes são dispersas por barocoria e zoocoria, sendo realizada principalmente por morcegos e macacos (Sano et al., 1999; Carvalho, 2003). Os morcegos contribuem de forma efetiva para a dispersão, já que eles carregam os frutos para consumi-los em outros locais, já os macacos podem atrapalhar a dispersão, pois conseguem quebrar o fruto e comer as sementes, sendo, mais predadores do que dispersores (Ferreira, 1980; Sano et al., 2004).

Espécies exóticas de abelhas africanizadas visitam flores de *D. alata*, entre outros insetos das ordens Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera, sendo importantes polinizadores, pois o fato de visitarem as flores acabam promovendo o fluxo de pólen entre os indivíduos (Pott & Pott, 1986; Oliveira & Sigrist, 2008) (Figura 3).



Figura 3. A presença da abelha *Apis mellifera* em visita à flor de baru promovendo a polinização (Fonte: Oliveira & Sigrist, 2008).

A utilização do baru é bastante ampla, aproveita-se desde a folha à raiz, podendo ser consumido *in natura* ou na fabricação de produtos alimentícios. Tendo também um grande potencial medicinal, madeireiro, forrageiro, industrial, sendo grandemente utilizado na recuperação de áreas degradadas, devido a sua alta produção de massa foliar, o que favorece o enriquecimento de nutrientes no solo. Sendo utilizado ainda como planta ornamental, no paisagismo e arborização, devido ao seu bom crescimento e baixa exigência de manejo (Almeida et al., 1998; Carvalho, 2003; Sano et al., 2004).

Para fins alimentares apresenta possibilidade de uso na nutrição humana e de animais. Tanto a polpa (endocarpo) quanto a amêndoa (semente) de baru podem ser utilizadas (Almeida et al., 1998) (Figura 4). A polpa abriga uma amêndoa dura e comestível, chamada de castanha do baru, que representa 5% do rendimento em relação ao fruto inteiro, apesar de ser ainda pouco utilizada na alimentação humana, apresenta um valor econômico considerável.



Figura 4. (A) A Coleta de frutos de baru, para fins alimentares, artesanais, entre outros (Fonte: Carrazza, 2010). **(B)** A presença do baru nas pastagens beneficia o gado em razão de fornecer abrigo (Fonte: Lázaro José Chaves, 2011).

A polpa é composta principalmente por amido, fibra insolúvel e açúcares, é rica em vitaminas e sais minerais como o potássio, cobre, ferro, cálcio, fósforo e magnésio. Apresenta um sabor adocicado e adstringente com elevados teores de taninos, que diminuem com a maturação do fruto (Togashi & Sgarbieri, 1994, 1995).

A semente é rica em cálcio, fósforo e manganês, além de ter um alto teor de macro e micronutrientes. A semente torrada apresenta sabor agradável, comparada com as do amendoim torrado, podendo ser utilizada para enriquecer pães, bolos, sorvetes, doces ou e bebidas alcoólicas (Togashi & Sgarbieri, 1994, 1995; Almeida, 1998). O óleo extraído da semente apresenta um alto teor de ácido oléico e linoléico de grande utilização na indústria alimentícia e farmacêutica. É utilizado como anti-reumático e apresenta propriedades sudoríferas, tônicas e reguladoras da menstruação, sendo também usado em tabacaria como aromatizante do fumo e produção de biodiesel (Ferreira, 1980; Togashi & Sgarbieri, 1995; Takemoto et al., 2001).

A madeira é pesada com densidade de 1,10 g/cm, com uma vida media de aproximadamente nove anos sendo altamente resistente a fungos e cupins. Apresenta uma

madeira de grande importância sendo utilizada para fins energéticos como carvão em indústrias siderúrgicas e de lenha como biomassa, essas finalidades devem ser exploradas com consciência a fim de ser evitado o extrativismo exagerado da espécie (Almeida, 1998; Paula, 1999).

A espécie *D. alata* é uma espécie que possui amplo potencial de utilização, em função desse grande potencial de utilização a associado a acelerada fragmentação do cerrado é importante realizar o estudos de variabilidade genética que subsidie estratégias de conservação da espécies.

3.5 Diversidade e Estrutura Genética Populacional

Os estudos com a variabilidade genética são realizados com intuito de avaliar a magnitude da diversidade genética presente nas subpopulações, e estimados a partir de parâmetros de diversidade genética. Assim a avaliação da diversidade genética nas populações os principais parâmetros estimados são: frequências alélicas, porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos (A), índice de fixação intrapopulacional ou coeficiente de endogamia (f), heterozigosidade observada e esperada sob equilíbrio de Hardy Weinberg (Nei, 1973, 1978; Frankham et al., 2003, 2008).

A análise da distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações, se iniciou com o surgimento das estatísticas-F (Wright, 1951). Posteriormente Weir & Cockerham (1984) apresentou outra maneira de avaliar a estrutura genética das subpopulações, a partir de um modelo de análise de variância de frequências alélicas. Os componentes de variância são usados para obtenção de três índices: F , f e θ que são análogos ao F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} respectivamente (Weir & Cockerham, 1984). Estas estimativas se subdividem em três índices: F_{IS} estima a correlação entre genes dentro de indivíduos e dentro de subpopulações, F_{IT} mede o nível de fixação gênica presente na população total (isto é, ignorando-se sua subdivisão), F_{ST} mede a diferenciação genética entre as subpopulações (Wright, 1951; Holsinger & Weir, 2009).

O estimador θ é uma medida de diferenciação entre subpopulações que é consequência da correlação entre genes de diferentes indivíduos na mesma subpopulação (Weir & Cockerham, 1984). Ao inserir divisões dentro de subpopulações, surgem dois novos estimadores, θ_s e θ_p . O θ_s é a correlação de genes entre indivíduos dentro de

progênes, indicando o grau de parentesco entre os indivíduos na progênie, e o θ_p refere-se à correlação de genes entre progênes dentro de subpopulações, refletindo o grau de diferenciação genética entre as subpopulações. O coeficiente de índice de fixação global de Wright (F) é um estimador de correlação entre genes dentro de indivíduos envolvendo todos os indivíduos da espécie, representada pelo conjunto de todas as subpopulações (Cockerham, 1973).

O coeficiente de endogamia (f), estimador da deficiência ou excesso de heterozigotos, sendo calculado com base nas heterozigosidades esperada e observada (Weir, 1996), sendo definido como a correlação entre as frequências alélicas de genes em um dado indivíduo. De acordo com Wright (1921,1922) e Nei & Syakudo (1958), os valores de f são exclusivos ao sistema reprodutivo, mantendo uma relação com a taxa de fecundação cruzada. A relação do coeficiente de endogamia e a taxa de fecundação cruzada aparente (t_a) é fornecida por Wright (1922) como: $f = (1 - t_a) / (1 + t_a)$ ou $t_a = (1 - f) / (1 + f)$. Essa fórmula assume que a única causa de endogamia na subpopulação é a autofecundação e que as subpopulações estão em equilíbrio de Wright.

Diversas técnicas são utilizadas para avaliar geneticamente as populações, permitindo evidenciar polimorfismos genéticos, a partir da análise direta do DNA. Dentre elas podem-se citar o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e SSR (Simple Sequence Repeats) ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Cada marcador molecular apresenta características próprias e a sua escolha depende dos objetivos da pesquisa a ser desenvolvida (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores microssatélites são uma ótima ferramenta para se estudar geneticamente as populações, devido características como: alto polimorfismo, seletivamente neutros, co-dominantes e ampla distribuição no genoma de eucariotos. Os microssatélites são formados por pequenas sequências de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Brohede & Ellegren, 1999).

A partir de dados obtidos por marcadores microssatélites, é possível estimar a variabilidade existente nas subpopulações de estudo. A variabilidade genética pode ser influenciada por vários fatores, dentre estes o sistema reprodutivo (Richards, 1990). As espécies que preferencialmente se reproduzem por fecundação cruzada, podem gerar maiores índices de variabilidade genética dentro das populações, enquanto aquelas que se

reproduzem preferencialmente por autofecundação possuem a maior parte da variabilidade genética entre as populações. Em função desses fatores, a avaliação da taxa de fecundação cruzada é importante para se reconhecer os efeitos do sistema reprodutivo na manutenção da variabilidade genética nas populações naturais (Kageyama et al., 1998)

A compreensão dos padrões de distribuição da diversidade genética e o nível de diferenciação são de fundamental importância para a definição de estratégias de conservação e uso sustentado desses recursos genéticos (Gribel, 2001), sendo importante no intuito de preservar a máxima variabilidade genética possível e subsidiar programas de conservação para diversas espécies (Loveless & Hamrick, 1984; Frankham et al., 2008; Cruz et al., 2011).

Estudos sobre a diversidade genética e estrutura genética baseada em marcadores microssatélites das espécies nativas do Cerrado, contribuem para o um acréscimo no conhecimento sobre este bioma, fornecendo suporte para seu manejo e conservação (Paiva, 1988; Frankham et al., 2003), com intuito de compreender melhor como esta organizado variabilidade e estrutura genética dessas espécies.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleção de germoplasma e coleta do material biológico

Este estudo foi conduzido utilizando-se plantas da espécie *D. alata* que constituem a coleção de germoplasma que é mantida *in vivo ex situ* em área experimental da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG). No estudo proposto por Mota (2013) que implementou a coleção a partir de sementes coletadas em áreas de ocorrência da espécie no Cerrado brasileiro, compondo 25 subpopulações amostradas durante o mês de agosto de 2011 (Figura 5) (Tabela 2).

Durante a coleta, em cada localidade (subpopulação) selecionaram seis árvores (matrizes) com produção suficiente de frutos, foram amostradas de forma não-sistemática, sendo coletados, pelo menos, 25 frutos por matriz, observando-se ponto de maturação fisiológica dos frutos e se estes não apresentavam danificações. Os frutos foram acondicionados em sacos telado, etiquetados com os dados de procedência e matriz, sendo então transportados para o Laboratório de Fitotecnia da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia (Figura 6).

Para formação da coleção, as sementes foram semeadas em viveiro, em condições de telado, com 50% de sombreamento e depois de germinadas as mudas foram transplantadas para o solo da estação experimental da EA/ UFG, obedecendo a um delineamento experimental de blocos completos casualizados. A organização deste delineamento ocorreu com base na estrutura de coleta onde, para cada uma das 25 subpopulações foram coletadas seis árvores (matrizes), (25x6) totalizaram com 150 tratamentos (progênie). Considerando que cada uma das seis árvores foram selecionadas quatro mudas (progênie) e que cada uma foi plantada em uma parcela obedecendo ao delineamento. Cada parcela se observa 150 tratamentos, estes que são repetidos quatro vezes, totalizando 600 indivíduos.

No período de coleta de folhas para a extração do DNA, as plantas apresentavam aproximadamente 10 meses do plantio, estavam vulneráveis, e para evitar a perda de indivíduos, deu-se preferência às folhas basais. As folhas, coletadas de todos os indivíduos da coleção, foram armazenadas em papel pardo e identificadas.



Figura 5. Mapa indicando 25 localidades de coleta no cerrado da espécie *D. alata* que compõe a coleção de germoplasma da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG. A coloração em cinza representa a área de abrangência do Bioma Cerrado.

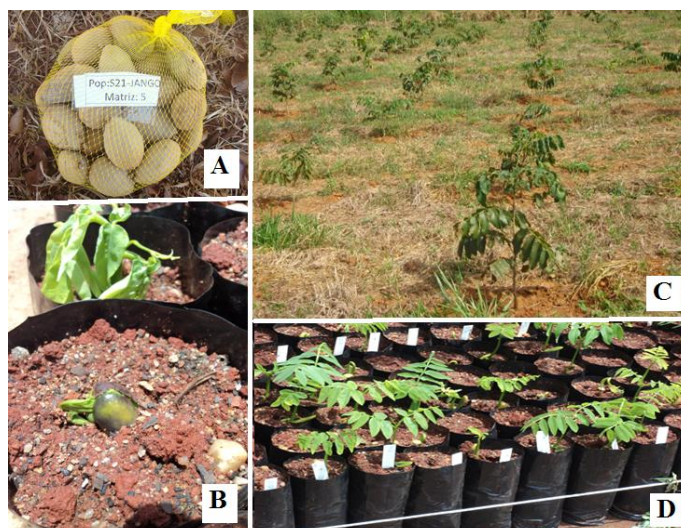


Figura 6. (A) Frutos de baru (*Dipteryx alata*) amostrados em sacos telados, indicando a matriz e o local de coleta. (B) Germinação dos frutos em casa de vegetação localizada na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG). (C) Coleção de germoplasma de *D. alata*, mantida *in vivo* em uma estação experimental pela (EA/UFG). (D) Plântulas de baru, antes de ser encaminhadas para coleção.

Tabela 2. Localidades e coordenadas geográficas das 25 subpopulações de *D. alata* Vog. amostradas no Cerrado.

Locais de coleta	Sigla da subpopulação	Nº de indivíduos por subpopulação	Latitude	Longitude	Altitude
Cocalinho-MT	CMT	23	S14 09.495	W51 15.004	246 m
Água Boa-MT	ABMT	22	S13 50.058	W52 02.325	292 m
Pirenópolis-GO	PGO	20	S16 00.220	W49 01.506	769 m
Sonora-MS	SMS	22	S17 50.337	W54 42.776	325 m
Alcinópolis-MS	ALC	22	S18 15.859	W53 56.202	407 m
Alvorada-TO	ATO	21	S12 26.471	W49 07.329	302 m
São Miguel do Araguaia-GO	SMGO	23	S13 13.772	W50 06.632	362 m
Luziânia-GO	LGO	22	S16 54.719	W50 12.121	613 m
Icém-SP	ISP	23	S20 24.027	W49 14.588	477 m
Monte Alegre de Minas-MG	MAMG	22	S18 58.789	W49 01.394	725 m
Estrela do Norte-GO	ENGO	22	S13 49.789	W49 08.394	398 m
Santa Terezinha-GO	STGO	23	S14 31.526	W49 37.244	584 m
Arinos-MG	AMG	23	S15 55.371	W46 07.986	524 m
Pintópolis-MG	PMG	20	S16 04.354	W45 11.215	517 m
Paraíso-MS	PMS	22	S18 58.292	W52 52.922	672 m
Terenos-MS	TRMS	20	S20 25.696	W55 03.477	257 m
Camapuã-MS	CMS	23	S19 31.509	W53 56.607	554 m
Indiara-GO	IGO	22	S16 44.108	W48 07.032	859 m
Barra do Garças-MT	BGMT	22	S16 06.380	W52 28.932	316 m
Várzea Grande – MT	VGMT	21	S16 14.704	W57 32.844	309 m
Jandaia-GO	JGO	22	S17 14.260	W49 57.722	597 m
Natividade-TO	NTO	22	S11 40.538	W47 43.121	327 m
Arraias-TO	ARTO	23	S12 56.646	W46 55.846	721 m
Aquidauana- MS	AQMS	21	S20 39.167	W55 59.910	222 m
Cárceres- MT	CAMT	19	S15 40.722	W56 18.895	252 m

4.2 Dados Moleculares

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido vegetal conforme o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987) e descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). Este protocolo utiliza o método CTAB 2% (cátion de brometo de hexadecil trimetil amônia) como detergente do tampão de extração. O DNA total de cada indivíduo foi armazenado à

temperatura de - 20° C, em tubos de 1,5ml etiquetados com informações sobre a sua procedência.

Após a extração, o DNA total das amostras foi quantificado por meio da técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose (1%), contendo tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) na concentração de 1X. Cada amostra foi preparada contendo 3µL de DNA e 4µL de tampão de carregamento. A eletroforese foi conduzida sob voltagem constante (70V), durante cerca de uma hora. Para coloração do gel, foram adicionados 0,6µL de Brometo de Etídeo no gel. Ao final do processo, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta com o auxílio do fotodocumentador LPIX da (Loccus Biotecnologia®). A quantificação foi realizada por comparação visual com o marcador de massa molecular *Low DNA Mass* da Invitrogen™.

A diluição do DNA foi realizada para uma concentração de trabalho de aproximadamente 2,5ng/µL. A qualidade do DNA diluído foi avaliada, com base na amplificação via PCR de um par de *primers* (Bm164), cujo fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida na concentração de 6%, com o sistema de eletroforese vertical utilizando cuba modelo *Sequi-Gen* (BioRad), com 70 watts por cerca de uma hora e meia. A coloração do gel foi realizada segundo o protocolo de Creste et al. (2001) e após a secagem das placas definiu-se a necessidade de ajustes de diluição do DNA.

Após diluição, o DNA dos indivíduos foi utilizado para a amplificação, via PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*), de nove marcadores microssatélites, sendo oito (DaE06, DaE12, DaE20, DaE34, DaE41, DaE46, DaE63 e DaE67) desenvolvidos e padronizados para a espécie *D. alata* (Soares et al., 2012) e um (BM164) desenvolvido para *Phaseolus vulgaris* e transferido para *D. alata* (Garcia et al., 2011) (Tabela 3).

As reações de PCR foram realizadas adicionando-se 5µL do DNA e 10µL de uma mistura (mix), contendo os reagentes necessários, totalizando um volume final de 15µL. O programa de termociclagem seguiu os seguintes passos: (1°) Desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos; (2°) 94°C por 1 minuto; (3°) temperatura específica de anelamento do *primer* por 1 minuto; (4°) Extensão da molécula pela enzima *Taq* DNA polimerase a 72°C por 1 minuto; (5°) 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passo; (6°) Passo final de extensão de 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático, sendo todo processo eletroforético realizado em um seqüenciador

ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para a obtenção dos genótipos, os dados fornecidos pelo sequenciador foram avaliados e editados no software *GeneMapper* (Prism, 2004).

Tabela 3. Relação dos marcadores microssatélites de *D. alata*, separados por conjunto de multiplex, incluindo as sequências dos *primers* e a fluorescência (*foward*) e (*reverse*), motivos de repetição da região microssatélite (MR) e temperatura de anelamento (TA).

	Marcador	Sequências de <i>primers</i> (<i>forwards</i>)	Sequências de <i>primers</i> (<i>reverse</i>)	MR	TA-°C	Amplitude
M1	DaE46	6-FAM- 5´ GCCTATGCGTCCTTCAGATT	TTTGTCCACATGCTTCTTTG	(TTA)5	54 ° C	247-253
	BM164	6-FAM- 5´ CCACCACAAGGAGAAGCAAC	ACCATTTCAGGCCGATACTCC	(GT)9 (GA)21 ¹	52 ° C	156-178
	DaE63	HEX- 5´ TGAAATTGAGGAAGCAAGGG	TCCTTTCAATCCTTTTAGAATTT G	(TC)6	52 ° C	208-214
	DaE41	NED- 5´ GCCTCCTCCTCCGGTATCTA	CAGCAGTGGGAGTGTCAGAA	(CA)5	60 ° C	118-148
M 2	DaE12	6-FAM- 5´ CCTTCTATGCGCTCTCTGCT	TACTTCAACGCCAGCTTCCT	(ATTTTT)18	58° C	216-222
	DaE20	HEX- 5´ AATAGCAGGGCACCATTAC	ACGTTTTTGCCGACATTCAT	(AG)8	54° C	146-158
	DaE34	HEX- 5´ ATCCTCTGCGTGCAATCTTT	CGCTTGCTGCTATTCCCTTC	(GA)15	58° C	104-124
	DaE06	NED- 5´ TGCAGCATAAAAATTGCGAA	TTACCCCAAAGCCTCAAGAA	(AAAT)17	58° C	212-220
	DaE67	NED- 5´ CAGACGGACCTGAGAGAAGG	AATTGAGGCTGATGTTTGGG	(GATACA)4	62° C	170-176

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese capilar, realizada em um sequenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os fragmentos microssatélites, amplificados via PCR, são injetados em capilares finos, preenchidos com polímero, para, em seguida foram submetidos a uma eletroforese em alta voltagem. A tensão gerada causa o movimento dos fragmentos de DNA através do polímero, em direção ao pólo positivo. Durante o trajeto as amostras passam pela região do laser, onde a fluorescência é detectada. Para a obtenção dos genótipos, os dados fornecidos pelo sequenciador foram avaliados e editados no software *GeneMapper* (Prism, 2004).

Após a genotipagem de todos os indivíduos, a confirmação dos alelos foi realizada a partir de uma nova eletroforese, contendo o menor número de indivíduos (em duplicata) que apresentassem todos os alelos identificados para cada loco, procedimento chamado de “escada alélica”.

4.3 Análises Estatísticas

Foram estimadas as frequências alélicas, a porcentagem de locos polimórficos (P) para cada subpopulação, obtida pela divisão do número de locos polimórficos pelo número total de locos. O número médio de alelos por loco (A) obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. A heterozigosidade esperada (He), assumindo-se Equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com Nei (1973) heterozigosidade observada (Ho) foi obtida pela média aritmética das proporções do número total de heterozigotos em relação ao número total de indivíduos entre os locos analisados, com base nas estimativas das heterozigosidades esperadas e observadas (He e Ho) foi calculado o índice de fixação ou coeficiente de endogamia (f) para cada loco, como medida da deficiência ou excesso de heterozigotos, estas estimativas foram geradas utilizando o programa GDA-Genetic Data Analysis versão 1.1.

As análises de estrutura genética foram realizadas com base nos coeficientes θ , F e f , conforme proposto por Weir & Cockerham (1984), que permitem investigar o padrão de variabilidade das frequências alélicas em um modelo hierárquico, utilizando θ_s e θ_p para análise das progênies e subpopulações, respectivamente. A consistência desses parâmetros (θ_p , θ_s , F e f) a partir de um procedimento de reamostragem, conhecido como Bootstrap, em que utiliza 10000 reamostragens para estabelecer os intervalos de confiança a 95 % para os valores de estrutura genética. Todas estas análises foram realizadas no software GDA Genetic Data Analysis.

Taxa de fecundação cruzada aparente (t_a) – foi estimada a partir da estimativa do f , utilizando essa equação: $f = (1 - t_a) / (1 + t_a)$ ou $t_a = (1 - f) / (1 + f)$.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Variabilidade Genética

Os nove locos microssatélites avaliados apresentaram um número médio de alelos igual a 5,5, variando de 2 (DaE67) a 14 alelos (DaE41) (Tabela 4). O número médio de alelos por loco foi menor do que o encontrado para outras espécies nativas do Cerrado, também avaliadas com microssatélites. Como exemplo, *Caryocar brasiliense* apresentou uma média de 16 alelos por loco em quatro populações (Collevatti et al., 1999); *Eugenia dysenterica*, 10,4 alelos por loco em 10 subpopulações (Zucchi et al., 2003) e 6,2 alelos por loco em um estudo com três subpopulações (Telles et al., 2013); *Tabebuia roseo-alba*, apresentou média de 8,9 alelos por loco em duas populações (Feres et al., 2009).

O número médio de alelos encontrado no presente estudo (5,5), foi superior ao encontrado por Melo et al., (2011) igual a 2,7, que avaliou a diversidade genética das árvores adultas dos mesmos pontos de coleta que originaram a coleção germoplasma do presente estudo. A diferença encontrada entre os estudos pode ser explicada pelas diferentes técnicas de detecção dos alelos, sendo que o presente estudo utilizou genotipagem em sequenciador automático. Enquanto que Melo et al. (2011) utilizaram eletroforese vertical em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Isso porque a detecção dos alelos em sequenciador automático é mais sensível, podendo diferenciar alelos com pouca diferença de tamanho (Medeiros, 2006; Guichoux et al., 2011).

Alguns estudos relacionam o número de alelos encontrado por loco com o tamanho do motivo de repetição (Ellegren, 2004). No presente estudo foi encontrado que os locos DaE06, DaE12, DaE67 com maior tamanho de motivos de repetição apresentaram baixo número de alelos por loco. No entanto por DaE20 que é um dinuclotideo foi encontrado um baixo número de locos sendo uma exceção para essa informação (Figura 7). Os demais locos apresentaram um maior número de alelos, quando comparado com os demais, o que é esperado para locos com menos motivos de repetições, uma vez que se esperam altas taxas de mutação em motivos menores (Ellegren, 2004) (Tabela 4) (Figura 8).

Tabela 4. Parâmetros de variabilidade genética para nove locos microssatélites analisados em *Dipteryx alata*, sendo que N: número de indivíduos por loco, A: número de alelos por loco, He: heterozigosidade esperada e Ho: heterozigosidade observada.

Locos	N	A	He	Ho
DaE06	548	3	0,162	0,102
DaE12	562	3	0,194	0,133
DaE34	565	9	0,764	0,469
DaE63	558	4	0,606	0,315
Bm164	561	8	0,322	0,241
DaE41	560	14	0,800	0,711
DaE46	538	4	0,686	0,612
DaE20	560	3	0,424	0,291
DaE67	552	2	0,238	0,181
Média	556	5,556	0,467	0,339

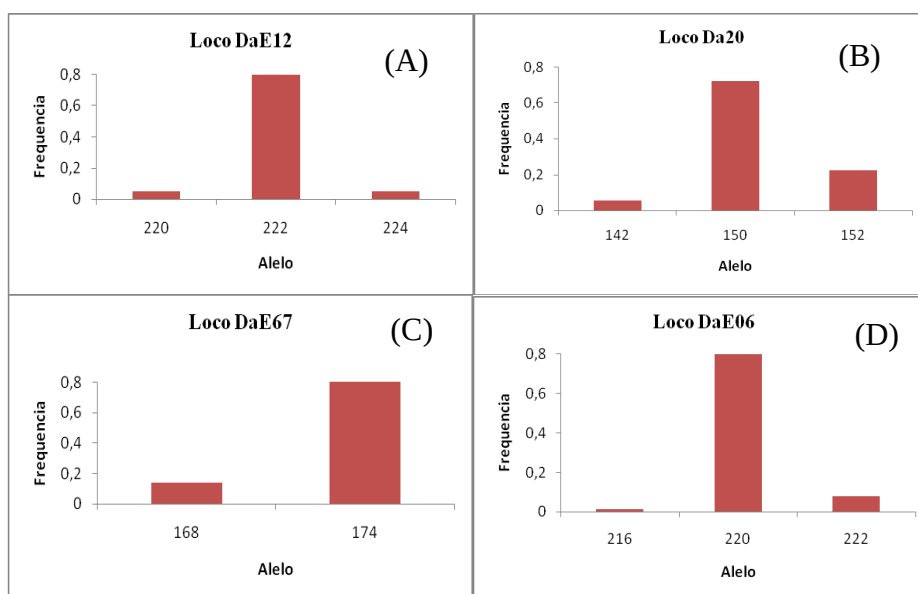


Figura 7. Distribuição das frequências alélicas nos locos DaE12 (A), DaE20(B), DaE67 (C), DaE06(D).

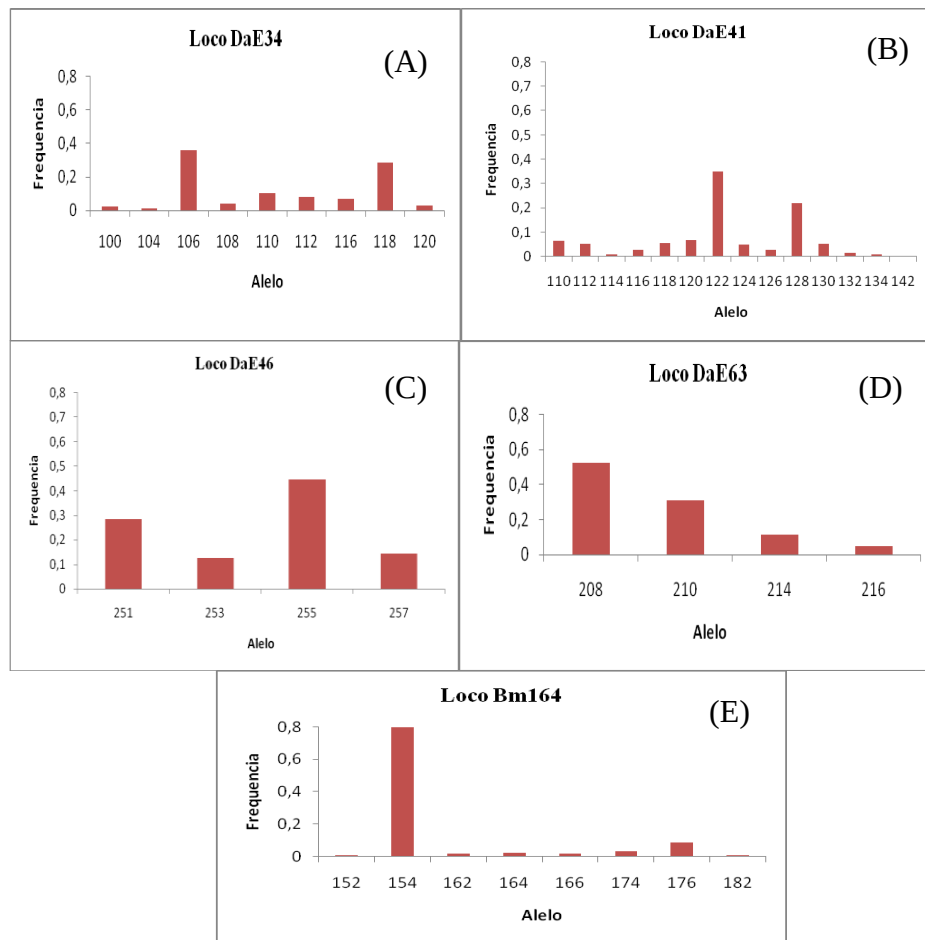


Figura 8. Distribuição das frequências alélicas nos locos DaE34 (A), DaE41 (B), DaE46 (C), DaE63 (D), Bm164 (E).

O número médio de alelos por subpopulação variou entre 1,74 (NTO) a 2,90 (PGO) com média de 2,12. A heterozigosidade esperada variou de 0,278 (NTO) e 0,484 (VGMT), e a observada variou de 0,225 (ARTO) e 0,420 (VGMT). Os valores médios da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram iguais 0,34 e 0,383. Portanto, com base no observado pelo número médio de alelos, a frequência alélica e heterozigosidade observada e esperada, para outras espécies do cerrado (Collevatti et al., 1999; Zucchi et al., 2003; Feres et al., 2009; Tarazi et al., 2010; Melo et al., 2011; Rodrigues, 2013; Telles et al., 2013), indicam que as subpopulações de *D. alata* apresentam uma moderada variabilidade genética detectada pelos marcadores microssatélites avaliados (Tabela 5). Analisando as 25 subpopulações, 20 apresentaram valores de f não significativos indicando ausência de endogamia. Enquanto as demais subpopulações (MAMG, CMS, IGO, AQMS

e CAMT) apresentaram valores significativos de f . Entretanto o valor médio de f foi significativo igual a 0,122, indicando presença de endogamia nas subpopulações (Tabela 5).

Em estudos como Tarazi et al. (2010), Melo et al. (2011) e Rodrigues, (2013), avaliaram a variabilidade genética de *D. alata*, utilizando marcadores microssatélites, apresentando valores similares aos encontrados neste estudo (Tabela 6). Isto sugere um padrão atual da diversidade genética para esta espécie, dentro das amostragens feitas até o presente momento

Tarazi et al. (2010) avaliaram três subpopulações de *D. alata* utilizando nove locos microssatélites transferidos da espécie *D. odorata* e encontraram um valor de f igual a 0,134, sendo este próximo ao encontrado neste estudo, indicando também a presença de endogamia. Outras espécies do cerrado, tais como *Caryocar brasiliense* por Collevatti et al. (2001), *Annona crassiflora* por Pereira (2007) e *Tibouchina papyrus* por Telles et al., 2011, que também apresentaram endogamia, possuem um sistema reprodutivo preferencialmente alógamo e foram analisadas com marcadores microssatélites, confirmando a presença de endogamia nestas espécies. Supondo que a única causa de endogamia na subpopulação é à autofecundação e que as subpopulações estão em equilíbrio de Wright, pode-se estimar a taxa aparente de fecundação cruzada (t_a), que neste estudo apresentou valor igual a 0,78. Isto sugere que a espécie tem um sistema misto de fecundação, sendo preferencialmente alógama. O que também é visualizado para espécie *Annona crassiflora* no trabalho de Pereira (2007), sendo está hermafrodita e preferencialmente alógama encontrou um valor de taxa aparente de fecundação cruzada igual a 0,723, semelhante ao observado no presente estudo para *D. alata*. Isso pode confirma a presença de certo grau de autofecundação nestas espécies.

Tabela 5. Estimativas de parâmetros de variabilidade genética subpopulacional estimados com base em nove locos microssatélites, avaliados em 25 subpopulações de *Dipteryx alata*, sendo que N: número de plantas analisadas, P: porcentagem de locos polimórficos, A: número médio de alelos, He: heterozigosidade esperada, Ho: heterozigosidade observada, f: índice de fixação intrapopulacional.

Subpopulação	N	P	A	He	Ho	f
CMT	23	0,685	2,185	0,357	0,333	0,080
ABMT	22	0,722	2,166	0,380	0,355	0,076
PGO	20	0,611	1,907	0,311	0,262	0,169
SMS	22	0,852	2,277	0,442	0,397	0,119
ALC	22	0,796	2,000	0,373	0,333	0,121
ATO	21	0,759	2,018	0,410	0,355	0,154
SMGO	23	0,759	2,148	0,391	0,360	0,095
LGO	22	0,704	2,000	0,355	0,293	0,190
ISP	23	0,667	2,074	0,358	0,318	0,127
MAMG	22	0,796	2,000	0,384	0,315	0,210*
ENGO	22	0,722	2,000	0,347	0,327	0,006
STGO	23	0,722	2,092	0,370	0,381	-0,035
AMG	23	0,815	2,462	0,442	0,395	0,120
PMG	20	0,685	1,777	0,329	0,310	0,069
PMS	22	0,815	2,333	0,409	0,360	0,138
TRMS	20	0,870	2,203	0,402	0,375	0,007
CMS	23	0,907	2,500	0,473	0,383	0,216*
IGO	22	0,722	2,074	0,385	0,329	0,176*
BGMT	22	0,722	2,148	0,369	0,343	0,088
VGMT	21	0,870	2,462	0,484	0,420	0,159
JGO	22	0,685	2,148	0,367	0,333	0,106
NTO	22	0,574	1,740	0,278	0,276	0,012
ARTO	23	0,630	1,814	0,281	0,225	0,224
AQMS	21	0,741	2,092	0,386	0,307	0,230*
CAMT	19	0,852	2,425	0,492	0,412	0,190*
Média	21,8	0,747	2,122	0,383	0,340	0,122*

(*) Indica valores significativos, com base no intervalo de confiança de 95% obtidos através do procedimento de bootstrap, utilizando 10000 reamostragens.

Tabela 6. Avaliação comparativa entre diferentes estudos conduzidos com *D. alata* utilizando de marcadores microsatélites, sendo que N: número de plantas analisadas, A: número médio de alelos, He: heterozigosidade esperada, Ho: heterozigosidade observada, f: índice de fixação intrapopulacional.

Trabalho	Nº Subpopulações	N	A	He	Ho	f
Presente trabalho	25	572	2,10	0,383	0,340	0,122
Tarazi et al. (2010)	3	101	3,067	0,387	0,341	0,134
Melo et al. (2011)	25	816	2,70	0,360	0,300	0,167
Rodrigues (2013)	6	234	2,91	0,452	0,58	-0,309

5.2 Estrutura Genética Populacional

O valor de θ_s estimado (0,169) indica uma alta diferenciação genética entre as progênes (Tabela 7). Este grau de diferenciação genética observado está relacionado com o parentesco dentro destas. O coeficiente de parentesco entre meios-irmãos é igual a 0,125 e para irmãos, igual a 0,25. Portanto, o nível de parentesco encontrado entre indivíduos dentro de progênie está acima do parentesco de meios-irmãos e menor que o de irmãos completos. Isto indica que as progênes são formadas por irmãos completos e meios-irmãos, não excluindo a possibilidade de ocorrência de irmãos por autofecundação, já que a espécie é autocompatível (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1983; Oliveira & Sigrist, 2008).

Tabela 7. Análise de variância de frequências alélicas hierárquica, segundo Weir (1990). Sendo que f: índice de fixação intrapopulacional, F: índice de fixação total, θ_s : o índice de fixação entre progênes dentro de subpopulações, θ_p : índice de fixação entre subpopulações.

Locus	f	F	θ_s	θ_p
DaE06	0,325	0,370	0,067	0,035
DaE12	0,228	0,312	0,109	0,039
DaE34	0,280	0,388	0,150	0,069
DaE63	0,229	0,484	0,331	0,189
Bm164	0,075	0,256	0,196	0,141
DaE41	-0,108	0,125	0,211	0,118
DaE46	0,043	0,110	0,070	0,042
DaE20	0,220	0,316	0,123	0,095
DaE67	0,126	0,240	0,131	0,081
Global	0,129	0,276	0,169	0,097
Teste de significância				
Limite superior	0,239	0,385	0,231	0,134
Limite inferior	0,021	0,177	0,110	0,063
Numero de repetições	10000	10000	10000	10000
Intervalo de confiança	95%	95%	95%	95%

Foi encontrado um valor estimado de θ_p igual a 0,097, sugerindo que existe uma moderada diferenciação genética entre as subpopulações (Tabela 7). Melo et al. (2011) utilizaram as mesmas subpopulações do presente estudo e foi observado um F_{ST} igual a 0,259, valor superior ao encontrado no presente estudo. Esta diferença pode ser explicada possivelmente pela forma em que foi realizada a amostragem dos estudos. Melo et al. (2011) amostraram subpopulações que poderiam conter uma estrutura de parentesco intrapopulacional, ou seja, a amostragem das subpopulações pode ter ocorrido em sobreposição de gerações. Isso pode superestimar a estimativa de estrutura genética em função do parentesco intrapopulacional. No presente estudo, foi realizado um delineamento com estrutura de progênie, o que permite controlar os efeitos de parentesco provenientes da estrutura familiar intrapopulacional. Deste modo, o resultado de estrutura genética entre subpopulações leva em consideração apenas os indivíduos adultos, ou seja, uma única geração, sendo então livre dos efeitos de parentesco devido à estrutura familiar.

Os resultados obtidos neste estudo apresentaram implicações importantes para a conservação da espécie *D. alata*, uma vez que os valores de estruturação da população θ_p foram moderados, resultando em implicações práticas, tanto sob o ponto de vista de uso como o de conservação de *D. alata*, uma vez que a presença de estruturação genética entre subpopulações, mesmo que pequena, torna necessária uma amostragem de um elevado número de subpopulações para garantir um tamanho efetivo adequado (Vencovsky, 1987).

A estimativa do índice de fixação global (F) foi igual a 0,27 e significativo. Diante disso pode concluir que a estruturação genética entre as subpopulações avaliadas no presente estudo, pode ser explicada tanto pelo sistema reprodutivo da espécie, em função do valor de f significativo, quanto por um efeito de deriva genética dentro das subpopulações associado a certa restrição ao fluxo gênico entre elas.

O presente trabalho complementou as informações já obtidas para esta coleção, e ainda, poderá fornecer suporte aos futuros programas de melhoramento e manejo. Por exemplo, se houver interesse em aumentar a coleção, este estudo indica que a melhor estratégia seria aumentar a amostragem tanto de subpopulações quanto de progênies dentro de subpopulações, em função dos graus de estruturação encontrados nestes níveis hierárquicos. Por outro lado, uma maior amostragem de indivíduos dentro de progênies não parece ser prioritária neste caso.

6. CONCLUSÕES

- A coleção de germoplasma de *D. alata*, mantida pela Escola de Agronomia da UFG exibe uma moderada variabilidade genética para os nove marcadores avaliados.
- Verifica-se a presença de endogamia nas subpopulações que compõem a coleção de germoplasma, porém de baixa magnitude.
- A estrutura genética molecular conservada na coleção pode ser considerada alta entre progênies e moderada entre subpopulações.

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, I. B. de; VALERI, S. V.; ISMAEL, J. J.; ALHO, D. R. Efeitos do espaçamento no desenvolvimento de *Dipteryx alata* Vog. em Jaboticabal – SP. **Revista do Instituto Florestal, Brasília**, v. 4, pt. 2, p. 570-572, 1992. 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas, São Paulo, 1992.

ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. da; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. p.83 (EMBRAPA-CPAC.) 1987.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa - CPAC, p.464. 1998.

BRASIL. **Convenção sobre a diversidade biológica**. Rio de Janeiro: Ministério do Meio Ambiente, 1994.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal**. Primeiro relatório nacional em decorrência do que dispõe o artigo 26 da Convenção sobre Diversidade Biológica; Brasil. Brasília, 283 p. 1998.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. **Theoretical and Applied genetics**, New York, v. 97, p. 816- 827, 1998.

BROWN, A. H. D. The genetic structure of crop landraces and the challenge to conserve them *in situ* on farms. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007a.

BROWN, A. Sir Otto Frankel. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007b.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. Bancos de germoplasma. In: BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. (Ed.). **Melhoramento de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, cap. 4, p. 22-26. 2001.

BULHÃO, C. F.; FIGUEIREDO, P. S. Fenologia de leguminosas arbóreas em uma área de cerrado marginal no nordeste do Maranhão. **Revista Brasil. Bot.**, v. 3, n. 3, p. 361–369, 2002.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. D. C.; AMARAL, Z. P. D. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1 p.1039, 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília: SPI, p. 40. 1994.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126, p. 455– 476, 2000.

CHANG, T. T. Evaluation of germoplasm: Rice In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

CLEMENT, C. R.; ROCHA, S. F. R.; COLE, D. M.; VIVAN, J. L. Conservação *on farm*. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, cap. 15. p. 511-544, 2007.

COCKERHAM, C.C. Analyses of gene frequencies. **Genetics**, 74: 679-700, 1973.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83 (Pt 6), n. August, p. 748–56, 1999.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, v. 2, p. 707. 1984.

CRESTE, C.; TULMANN, N.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 299-306, 2001.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504-509, 2004.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem Bull Bot. Soc. Amer.**, v. 19, p. 11-15, 1987.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.

FALEIRO, F.G. **Marcadores Genéticos - Moleculares associados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

Freitas, A. S. **O papel das instituições públicas no desenvolvimento de novas variedades de plantas cultivadas**. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) Universidade do Rio Grande do Sul, Centro de Pesquisa em Agronegócio, Programa de pós graduação em Agronegócio. Porto Alegre. 2006

FERES, J. M.; MARTINEZ, M. L. L.; MARTINEZ, C. A; MESTRINER, M. A; ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular ecology resources**, v. 9, n. 1, p. 434-437, 2009.

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis nativos do Cerrado em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v.6, n.61, p.9-18. 1980.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 2.ed. Brasília: Embrapa - Cenargen, p. 220, 1998.

FERREIRA, M. A. J. F, WETZEL, M. M. V. S., VALOIS, A. C. C. **El estado del arte de los recursos genéticos en las Américas: conservación, caracterización y utilización**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología e Programa Cooperativo de Investigación y Transferencia de Tecnología para los Trópicos Suramericanos. 2005.

FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, S. M.; MAYOR, M. S.; MESTRINER, M. A.; SOUZA, A. P.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 5, p. 1281-1285, 2007.

FRANKHAM, R., BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge, Cambridge University Press, p. 220. 2003.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.; BRISCOE, D. **Fundamentos de genética da conservação**: Sociedade Brasileira de Genética. Editora SBG, p.262. 2008.

FRANZON, R. C. Fruteiras nativas do Cerrado têm potencial para exploração. Planaltina, DF:**EmbrapaCerrados**,2009.Disponível:em:<<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigo-smidia/publicados/131/>>. Acesso em: 16 nov. 2009.

GARCIA, R. A V; RANGEL, P. N.; BRONDANI, C.; MARTINS, W. S.; MELO, L. C; CARNEIRO, M. S. The characterization of a new set of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers as a resource for the genetic analysis of *Phaseolus vulgaris*. BMC genetics, v. 12, n. 1, p. 41, BioMed Central Ltd. 2011.

GIACOMETTI, D. C. The management of genetic resources as a component of biological diversity. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

GIACOMETTI, D. C.; FERREIRA, F. R. Organização e uso dos bancos de Germoplasmas de frutíferas. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

GIACOMETTI, D. C.; WETZEL, M. M. V. S. Germoplasma vegetal para pesquisa fitotécnica no Brasil. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

GOEDERT, C. O.; WETZEL, M. M. V. S. Sistema de curadorias de germoplasma e o programa de conservação e uso de recursos genéticos do sistema Embrapa. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

GOEDERT, C. O.; WETZEL, M. M. V. S. **Sistema de curadorias de germoplasma e o programa de conservação e uso de recursos genéticos do sistema Embrapa**. In: Simpósio de Recursos Genéticos para América Latina e Caribe – SIRGEALC, Anais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

GOEDERT, C. O; VALLS, J. F.; VEIGA, R. F. DE A. Biodiversidad y recursos genéticos In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

GOUDET, J. **FSTAT**. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices: Version 2.9.3.2. 2002.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, o manejo e a conservação dos recursos naturais. **Humanidades – Biologia**. v.48, p. 111-117. 2001.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 4, p. 591–611, 2011.

HARDY, O. J. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1577-1588, 2003.

HARTL, D.; CLARK, A. Princípios de genética de populações. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p. ou HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. 3.ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., p.542. 1997.

HEDRICK, P. W. **Genetics of Populations**. 2. ed. Massachussetts: Jones and Bartlett Publishers, 2000.

HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: the organization of the stigma in *Trifolium pratense* L. **Annals of Botany** 51:571-583. 1983.

HINTUM, T.J.L. van; BROWN, A.H.D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. Core collections of plant genetic resources. Rome: **International Plant Genetic Resources Institute**, p.48 2000.

HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating, and interpreting Fst. **Nature Reviews - Genetics**, v.10, p.639-650. 2009.

HOYT, E. **Conserving the wild relatives of crops**. Roma: International Board for Plant Genetic Resources, p. 45 1988.

IBPGR. **Elsevier's dictionary of plant genetic resources**. Roma: International Board for Plant Genetic Resources, p. 18. 1991.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN, T. Molecular tools in plant genetic resources conservation : A guide to the technologies. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome Italy, 1997.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70. 1998.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário – Biotecnologia**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LI, D. Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in plant science**, v. 14, n. 11, p. 614–21, 2009.

LIU, F.; BOTHMER, R. von; SALOMON, B. Genetic diversity among East Asian accessions of the barley core collection as revealed by six isozyme loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.1226-1233, 1999.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos de Flora Ltda. v.1, 4.ed. p.368. 2002

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology Systematics**, Palo Alto, v.15, p. 65-95, 1984.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 6, p. 957–969, 2006.

MELO, D. B.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; OLIVEIRA, G.; et al. Optimizing sampling efforts for ex situ conservation of genetic variability of *Dipteryx alata* Vogel. **BMC Proceedings**, BioMed Central Ltd. v. 5, n. Supl 7, p. 18. 2011.

MEDEIROS, A. C. B. DE. **Desenvolvimento, Caracterização e Estimativas de Erros de Genotipagem de locos Microssatélites de *Tabebuia aurea* (bignoniaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília 2006.

NABOUT, J. C.; SOARES, T. N.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; et al. Combining multiple models to predict the geographical distribution of the Baru tree (*Dipteryx alata* Vogel) in the Brazilian Cerrado. **Revista brasileira de biologia**, v. 70, n. 4, p. 911–9, 2010.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento – plantas. Rondonópolis: Fundação MT, cap 2, p. 29-55. 2001.

NEI, M. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

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

NEI, M. & SYAKUDO, K. The estimation of outcrossing in natural populations. *Japan. J. Genetics* 33:46-51. 1958.

OGLIARI, J. B.; BOSCARIOL, L. B.; CAMARGO, L. E. A. Optimization of PCR amplification of microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 395-398, 2000.

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

OLIVEIRA, M. I. B.; SIGRIST, R. Fenologia reprodutiva, polinização e reprodução de *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae-Papilionoideae) em Mato Grosso do Sul , Brasil 1. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 195–207, 2008.

OLIVEIRA, A. N. **Variação genética entre e dentro de procedências de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Departamento de Engenharia Florestal, Lavras, MG. p.80. 1998.

PAIVA, J. R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, p. 135, 1988.

PAULA, J. E. Caracterização anatômica de madeiras nativas do cerrado com vistas à produção de energia. **Cerne**, v.5, n.2, p.26-40, 1999.

PEREIRA, M. F. **Desenvolvimento de Marcadores Moleculares SSR e caracterização Genética de Populações Naturais de *Annona crassiflora* Mart. do Estado de Goiás**. Tese de doutorado, UFG, 2007.

POTT, A.; POTT, V. J. Espécies de fragmentos florestais em Mato Grosso do Sul. In: Costa, R. B. (ed.). **Fragmentação Florestal e Alternativas de Desenvolvimento Rural na Região Centro-Oeste**. Campo Grande: UCDB. p.26-52. 2003.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas comestíveis e medicinais da nhicolândia, pantanal**. Embrapa, 1986.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido**: abordagem sócio-econômica. Rio de Janeiro: AS-PTA, p.206.1993.

RAYMOND, F. Keeping our promise: the global conservation trust. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

RIBEIRO, J. F.; SANO, S. M.; BRITO, M. A.; FONSECA, C. E. L. Baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Jaboticabal: Funep** - Série Frutas Nativas, p.41. 2000.

RICHARDS, A. J. Plant Breeding Systems. Cambridge, **University Press**. p. 529. 1990.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso**. Embrapa cerrados - Brasília DF, 2004.

SANO, S. M.; VIVALDI, L. J.; SPEHAR, C. R. Diversidade morfológica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 513–518, 1999.

SANO, S. M.; FONSECA, C. E. L.; SILVA, J. A.; CHARCHAR, M. J. A. **Teste de progênies de baru, jatobá e mangaba**. Planaltina, DF: Embrapa - CPAC, p.4 1994.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Criopreservação de germoplasma vegetal**. In: NASS, L. L. (Ed.). Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, cap. 16. p. 545-574. 2007.

SCARIOT, A. O.; SEVILHA, A. C. **Conservação *in situ* de Recursos Genéticos Vegetais**. In: NASS, L. L. (Ed.). Recursos Genéticos Vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

SILVA-JÚNIOR, M. C. **100 Árvores do Cerrado**. Brasília: Ed. Rede de Sementes do Cerrado, p. 278. 2005.

SIQUEIRA, A. C. M. F.; NOGUEIRA, J. C. B.; KAGEYAMA, P. Y. Conservação dos recursos genéticos *ex situ* do cumaru (*Dipteryx alata*) Vog. Leguminosae. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 231-243, 1993.

SIQUEIRA, J. C. Plantas do cerrado na medicina popular. Spectrum (São Paulo): **Jornal Brasileiro de Ciências**, São Paulo, SP, v. 2, n. 8, p. 41-44, 1982.

SOARES, T. N. **Estrutura genética e fluxo gênico via pólen e semente entre subpopulações de *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae)**. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; TELLES M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; RESENDE, L. V. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, v. 132, n. 1, 2008b.

SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; TELLES, M. P. DE C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; RESENDE, L. V. Distribuição espacial da variabilidade genética intrapopulacional de *Dipteryx alata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 1151–1158, 2008a.

SOARES, T. N.; MELO, D. B.; RESENDE, L. V.; et al. Development of microsatellite markers for the neotropical tree species *Dipteryx alata* (Fabaceae). **American journal of botany**, v. 99, n. 2, p. 72–73, 2012.

SOARES, T. N.; SANT’ANA, L. L.; OLIVEIRA, L. K. DE; TELLES, M. P. C.; COLLEVATTI, R. G. Transferability and characterization of microsatellite loci in *Anacardium humile* A. St. Hil. (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3146–3149, 2013.

TAKEMOTO, E.; OKADA, I. A.; GARBELOTTI, M. L.; TAVARES, M.; AUEDPIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 60, n. 2, p. 113-117, 2001.

TARAZI, R.; MORENO, M. A.; GANDARA, F. B.; et al. High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian Cerrado fruit tree *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 78–85, 2010.

TELLES, M. P. C. **Diversidade genética e estrutura populacional de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) do Sudeste de Goiás**. Dissertação (Mestrado em Agronomia:

Genética e Melhoramento de Plantas)—Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

TELLES, M. P. C.; PEIXOTO, F. P.; LIMA, J. S.; PEIXOTO, F. P.; LIMA, J. S.; RESENDE, L. V.; VIANELLO, R. P.; WALTER, M. E. M. T.; COLLEVATTI, R. G. Development of microsatellite markers for the endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). **Genetics and Molecular Research : GMR**, v. 10, n. 1, p. 321–5, 2011.

TELLES, M. P. C.; SILVA, J. B.; RESENDE, L. V.; VIANELLO, R. P.; CHAVES, L. J.; SOARES, T. N.; COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of new microsatellites for *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). **Genetics and Molecular Research : GMR**, v. 12, n. 3, p. 3124–3127, 2013.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Avaliação nutricional e da proteína e do óleo de semente de baru (*Dipteryx alata* Vog.). Campinas, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 1, p. 66-69, jan.-jun, 1995.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Caracterização química parcial do fruto do baru (*Dipteryx alata* Vog.). Campinas, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 14, n. 1, p. 85-95, 1994.

TOLEDO-FILHO, D. V. Competição de espécies arbóreas de cerrado. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo, n. 42, p. 61-70, 1988.

TOLEDO-FILHO, D. V.; PARENTE, P. R. Essências indígenas sombreadas. Silvicultura em São Paulo, **Anais do Congresso Nacional sobre Essências Nativas**, Campos do Jordão. v.16-A, n. 2, p. 948-956, 1982.

VALOIS, A. C. C. **Benefícios e Estratégias de Utilização Sustentável da Amazônia**. Brasília: Embrapa. 2003.

VALOIS, A. C. C. Conservação de germoplasma vegetal *ex situ*. **IICA-PROCISUR**, Montevideu, cap. 2, p. 7-13, 1996.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. **Conservação *ex situ* de Recursos Genéticos Vegetais**. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento – plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap 6, p. 123-147.

VASCONCELOS, E. S.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; FERREIRA, A. Estratégias de amostragem e estabelecimento de coleções nucleares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n. 4, p. 507-514, 2007.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasmas de espécies alógamas. **IPEF**, n.35, p.79-84, abr. 1987.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 11–42, 2000.

VOLIS, S.; YAKUBOV, B.; SHULGINA, I.; WARD, D.; MENDLINGER, S. Distinguishing adaptive from nonadaptive genetic differentiation: comparison of QST and FST at two spatial scales. **Heredity**, v. 95, n. 6, p. 466-475, 2005.

WADT, L. H. O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.D.C.) visando seu uso e conservação**. 2001. Tese (Doutorado em Genética da Conservação) - Escola Superior de Agricultura, USP, Piracicaba, 2001.

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

WEIR, B. S.; Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, Massachussets: **Sinauer Associates Inc**, p.192, 1996.

WRIGHT, S. The genetical structure of population. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 395-420, 1951.

WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics** 6:111-178. 1921.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist**, v.56, p.330- 338, 1922.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R.. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, p. 449–457, 2003.