

**SIVANY RODRIGUES CHAVES**

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE  
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Caryocar brasiliense* CAMB. NO  
ESTADO DE GOIÁS UTILIZANDO MARCADORES  
MOLECULARES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

**Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov**

Goiânia, GO – Brasil

2005

**Chaves, Sivany Rodrigues.**  
**C512c** **Caracterização da estrutura genética de populações naturais de *Caryocar brasiliense* Camb. no estado de Goiás utilizando marcadores moleculares microssatélites [manuscrito] / Sivany Rodrigues Chaves.– 2005.**  
**67 f. : il., figs, tabs.**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov.**

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2005.**

**Bibliografia: f. 59-67**

**Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.**

**1. Cerrado 2. frutíferas 3. pequi 4. variabilidade genética 5. polimorfismo I. Título.**

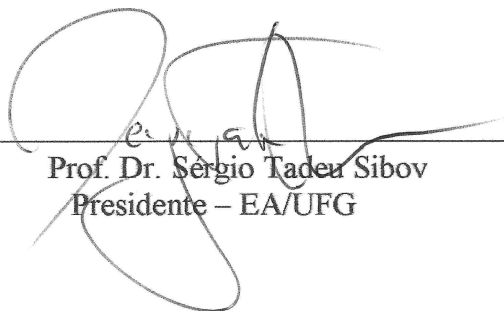
**CDU: 582.819(817.3)**



**SIVANY RODRIGUES CHAVES**

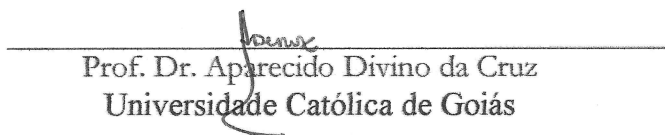
**“CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA  
DE POPULAÇÕES DE *Caryocar brasiliense* Camb. NO  
ESTADO DE GOIÁS UTILIZANDO MARCADORES  
MOLECULARES MICROSSATÉLITES”**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 25 de agosto  
de 2005, pela Banca Examinadora constituída pelos  
membros:



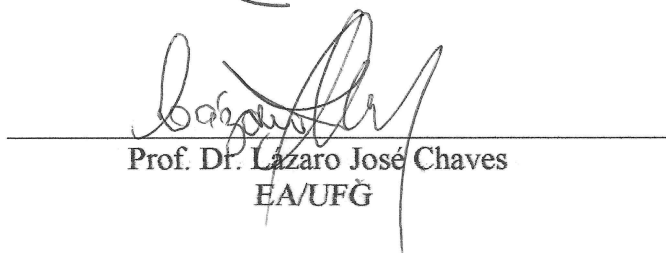
---

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov  
Presidente – EA/UFG



---

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz  
Universidade Católica de Goiás



---

Prof. Dr. Lázaro José Chaves  
EA/UFG

Aos meus pais, Jerônimo R. Chaves (*in memorian*) e Madalena Guerreiro Chaves (*in memorian*) e ao meu irmão, Anilson R. Chaves (*in memorian*) cujos exemplos, de fé e de coragem sempre me guiaram.

*Dedico*

À Alessandra R. Chaves, minha filha, aos meus irmãos William R. Chaves e Sirlene R. Chaves pelo sacrifício, carinho e compreensão e aos demais, Jerônimo R. Chaves Filho, Sileny R. Chaves, Humberto R. Chaves e Wilsom R. Chaves pelo apoio.

Essa conquista é de todos nós.

*Ofereço*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq que forneceu recursos financeiros para que eu pudesse me dedicar à elaboração desta dissertação.

Ao CENARGEN, na pessoa da Dr<sup>a</sup> Ana Y. Ciampi, cuja parceria foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto.

Ao departamento de Pós-Graduação da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, na pessoa do Wellington, pela amizade e compreensão que muito me auxiliaram.

Ao Prof. José Baldin Pinheiro que forneceu as primeiras orientações para que eu pudesse ingressar no programa de Pós-Graduação.

Aos amigos que conquistei durante o curso de mestrado: Fabiana Reis, Robertha Garcia, Angel Blanco, Maria Mônica Cintra e Ana Carolina Stacciarini, cujas horas de estudo muito contribuíram para o meu aprendizado.

Aos meus professores: Prof. Dr. João Batista Duarte, pela retidão com a qual conduz seus alunos; Prof. Dr. Lázaro José Chaves, pela coordenação do projeto Frutíferas do Cerrado e por sua ajuda nas coletas; Prof. Dr. Ronaldo Veloso Naves, sem o seu apoio as coletas não teriam sido realizadas; Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Monalisa Sampaio Carneiro pelo incentivo nos momentos críticos; Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho por ter me auxiliado todas as vezes que solicitei e pelas aulas ministradas, que de forma muito especial contribuíram para elaboração desta dissertação. A todos eles e a cada um em particular, agradeço pelos ensinamentos que recebi.

A todos os meus alunos, por terem compreendido o meu afastamento da sala de aula quando ingressei no mestrado.

Aos meus amigos, em particular, à Prof<sup>a</sup> Cleide Maria Ribeiro e Camanduacaia, ao Prof. Antônio César da Costa Ferreira, à Prof<sup>a</sup> Denise Prado de Alencar e à Prof<sup>a</sup> Rosirene Dias Rosa, cuja compreensão e tolerância foram fundamentais nesses dois últimos anos.

Aos meus amigos do Núcleo de Pesquisas Replicon, da Universidade Católica de Goiás, que muitas vezes foram o meu refúgio nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, meu professor, co-orientador e amigo sempre presente desde a graduação, a quem muito devo, respeito e admiro.

A Embrapa Arroz e Feijão, nas pessoas do Dr. Cláudio Brondanni e Dra Rosana Brondanni, por terem disponibilizado condições para que eu pudesse aprender como trabalhar com gel de poliacrilamida.

Ao Magno Cândido da Silva Junior, aluno de graduação em Biologia da UCG, por estar comigo desde o início e por suas infindáveis horas, principalmente, de extrações de DNA. À Daniela Vieira Cândida e Flávia Cristina Teixeira Silva, graduandas de Biologia da UEG que apesar de estarem comigo a menos tempo, não tiveram contribuição menor.

Aos amigos e demais estagiários do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas do Setor de Melhoramento da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG que muito contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. Pois, a título de aprendizagem, muito me auxiliaram no preparo das PCRs, aplicação e revelação de géis.

Aos donos das propriedades que permitiram que as coletas fossem efetuadas e à amiga Eloísa, de quem adquiri os dados iniciais para elaboração desta dissertação, bem como, o prazer de sua companhia durante as coletas.

Agradeço de modo muito especial ao meu orientador, Professor Dr. Sérgio Tadeu Sibov, que comemorou e sofreu comigo todos os sucessos e insucessos. Por sua paciência, sabedoria, amizade e carinho me conduzindo e por sua presença incondicional durante todo o processo de minha formação.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>10</b>
<b>GENERAL ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 EVOLUÇÃO E ADAPTAÇÃO DAS PLANTAS .....	16
2.2 FAMÍLIA CARYOCARACEAE .....	17
2.3 POTENCIAL ECONÔMICO DO PEQUIZEIRO .....	21
2.4 UTILIZAÇÃO DO PEQUIZEIRO .....	22
2.5 PERSPECTIVAS NA INDÚSTRIA QUÍMICA, FARMACÊUTICA E ALIMENTÍCIA.....	23
2.6 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA .....	24
2.7 CONSERVAÇÃO.....	25
2.8 MARCADORES MOLECULARES E SEU USO EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA.....	27
2.9 ANÁLISES DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	31
2.9.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Equilíbrio de Wright.....	31
2.9.2 Estatísticas F de Wright.....	33
2.9.3 Estimativas de diversidade genética.....	34
2.9.4 Estimativas de $R_{ST}$ .....	35
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE DE COLETA.....	37
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	38
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	39
3.3.1 Marcadores microssatélites.....	39
3.3.2 Otimização dos locos microssatélites em pequizeiro.....	40
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
4.1 MEDIDAS DE DIVERSIDADE GENÉTICA.....	43
4.1.1 Número de alelos por loco.....	43
4.1.2 Heterozigosidades.....	45
4.1.3 Coeficiente de fixação $\hat{f}$ .....	46

<b>4.1.4</b>	<b>Teste de EHW.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Alelos exclusivos.....</b>	<b>47</b>
4.2	ESTRUTURA GENÉTICA.....	48
<b>4.2.1</b>	$\hat{F}_{ST}$ e $\hat{R}_{ST}$ .....	48
<b>4.2.2</b>	$\hat{N}_m$ .....	<b>49</b>
4.3	CORRELAÇÕES ENTRE DISTÂNCIAS.....	50
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição em ácidos graxos de óleo de pequi e de manteiga de cacau.....	24
<b>Tabela 2.</b> Municípios onde foram realizadas as coletas de folhas de pequizeiros, (A) – altitude média; ( $t_m$ /dia) – temperatura média; (UR) – média da umidade relativa do ar; (Pr) – precipitação média anual; (LS) – Latitude Sul; (LO) – Longitude Oeste e predominância do ambiente de coleta, utilizadas para este estudo.....	37
<b>Tabela 3.</b> Programação inicial para amplificação dos locos de microssatélites em pequi. ....	39
<b>Tabela 4.</b> Temperaturas de anelamento ( $T_a$ ), concentração de cloreto de magnésio [ ], microssatélites (SSR), que apresentaram melhor resolução para genotipagem dos indivíduos em gel desnaturante de poliacrilamida 6%. ....	40
<b>Tabela 5.</b> Número de alelos por loco e por população de <i>C. brasiliense</i> .....	43
<b>Tabela 6.</b> Número de indivíduos amostrados por população e por loco.....	44
<b>Tabela 7.</b> Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade genética em onze populações de <i>C. brasiliense</i> .....	45
<b>Tabela 8.</b> Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando 8 locos de microssatélites. (Os dados em negrito são referentes ao locos que não se encontram em EHW). ....	46
<b>Tabela 9.</b> Frequência absoluta e relativa de alelos privados no conjunto de onze populações de <i>Caryocar brasiliense</i> .....	47
<b>Tabela 10.</b> Estimativa das estatísticas $\hat{F}$ de Wright, de $\hat{R}_{ST}$ e do número de migrantes por geração ( $\hat{N}_m$ ) baseado no $\hat{F}_{ST}$ em 11 populações naturais de <i>C. brasiliense</i> . Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade.....	479
<b>Tabela 11.</b> Distância genética obtidas pela distância de Nei (1972) entre pares de populações .....	51
<b>Tabela 12.</b> Distâncias geográfica entre pares de populações, obtidas pelas coordenadas geográficas de onze populações de <i>C. brasiliense</i> no Estado de Goiás .....	52
<b>Tabela 13.</b> Distâncias genéticas obtidas pela distância de Nei (1972) entre pares de regiões .....	53

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Caryocar brasiliense* subespécie *brasiliense* (Planta jovem) ..... 18
- Figura 2.** *Cariocar brasiliense* subespécie *intermedium* ..... 18
- Figura 3.** Fruto do pequiheiro. As setas indicam as partes do fruto: exocarpo, mesocarpo, endocarpo, espinhos endocárpicos e amêndoa. .... 20
- Figura 4.** Diferentes modelos de fluxo gênico. A: Modelo continente-ilha; B: Modelo Alpondras; C: Modelo de ilha; D: Modelo de isolamento por distância. .... 27
- Figura 5.** Localização geográfica dos municípios onde foram realizadas as coletas de folhas de *Caryocar brasiliense*. .... 36
- Figura 6.** Padrão de polimorfismo apresentado pela população de Alvorada do Norte, utilizando o loco de microssatélite *Cb9* visualizados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%. À esquerda, o marcador de peso molecular, *Ladder* 10 pb. .... 42
- Figura 7.** Padrão de polimorfismo apresentado pela população de Damianópolis, utilizando o loco de microssatélite *Cb3* visualizados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%. À esquerda, o marcador de peso molecular, *Ladder* 10 pb. .... 43
- Figura 8.** Modelo de Alelos Infinitos – (Kimura & Crow, 1964)..... 49
- Figura 9.** Modelo de *stepwise* (Kimura & Ohta, 1978). .... 49
- Figura 10.** Padrão de identidade genética entre 11 populações de pequiheiro, definido pelo agrupamento UPGMA, obtida a partir das distâncias genéticas de Nei (1972)..... 51
- Figura 11.** Representação da correlação (*r*) entre a matriz de distâncias geográficas e matriz de distâncias genéticas, obtidas de 8 locos de microssatélites em 11 população de *C. brasiliense* no Estado de Goiás em 2005. Significância de *r* dada pela probabilidade ..... 52
- Figura 12.** Padrão de identidade genética entre as 4 regiões do Estado de Goiás, onde foram obtidas as populações de pequiheiro, definido pelo agrupamento UPGMA, obdida a partir das distâncis genéticas de Nei (1972)..... 53

## RESUMO

CHAVES, S.R. **Caracterização da estrutura genética de populações naturais de *Caryocar brasiliense* Camb. no Estado de Goiás, utilizando marcadores moleculares microssatélites.** 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 2005.<sup>1</sup>

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) é uma espécie frutífera do Cerrado brasileiro que possui grande potencial econômico e social. Este estudo visa o acúmulo de informações para um programa eficiente de domesticação da espécie e sua conservação. Onze populações naturais de pequi, contendo 30 indivíduos cada, foram amostradas em cinco regiões diferentes do Estado de Goiás. A estrutura genética dessas populações foram avaliadas utilizando a variação de oito locos microssatélites, em cerca de 330 indivíduos. O número de alelos por loco variou de 22 a 32 (média de 28). As heterozigosidades esperada e observada variaram de 0,843 a 0,920 e de 0,546 a 0,758, respectivamente. Medidas da diferenciação genética indicaram diferenças significativas entre as populações ( $F_{ST} = 0,064$  e  $R_{ST} = 0,439$ ). Os valores de  $R_{ST}$  entre as amostras foram altos e muito maiores que  $F_{ST}$  indicando uma divergência entre o modelo que considera os alelos serem idênticos por descendência e o modelo de identidade por estado nestas populações. O número estimado de migrantes foi elevado,  $Nm = 3,63$  na média. Não foi encontrada correlação significativa entre as distâncias geográficas e as medidas de diversidade genética, sugerindo que provavelmente ocorreu um intenso fluxo no passado unindo as populações hoje separadas.

*Palavras-chave:* Cerrado, frutíferas, pequi, variabilidade genética, polimorfismo.

---

<sup>1</sup> Orientador – Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov – ICB-UFG.

## ABSTRACT

CHAVES, S.R. **Characterization genetic structure of natural populations of *Caryiocar brasiliense* Camb. in the Goiás State, using molecular microssatélites markers.** 2005. 68 f. Dissertation (Master in Agronomy: Genetic and Plant Breeding) –Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2005.<sup>1</sup>

The species *Caryiocar brasiliense* Camb. (pequi) is a common tree fruitful in the Brazilian savannah (Cerrado) with great economic and social potential. The objective of this study goals the increase of information for an efficient breeding program for specie domestication and conservation. Eleven natural populations of “pequi”, 30 individuals each, was sampled on five different regions of Goiás state. The genetics structure of these natural populations was analyzed based on variability at eight microsatellite loci in about 330 individuals. The number of alleles per locus it varied of 22 to 32 (mean = 28). The waited and observed heterozigosity varied of 0,843 to 0,920 and 0,546 to 0,758, respectively. Measures of genetic differentiation indicated significant differences between most populations ( $F_{ST} = 0,064$  and  $R_{ST} = 0,439$ ).  $R_{ST}$  values among samples were high and much higher than  $F_{ST}$  indicating a divergence between the model that consider alleles to be identical by descent, and the model of identity by state in these populations. Estimated number of migrants was high,  $Nm = 3,63$  (mean), and the existence of private alleles indicated reduced gene flow and a consequently possible damage to the metapopulations structure. Significant correlation was not found between geographical distance and measure of genetic divergence, suggesting the intense gene flow in the past that joined the populations that are separated today.

*Key Words:* Cerrado, fruitful, pequi, genetic variability, polymorphism.

---

<sup>1</sup> Adviser: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov – ICB-UFG.

## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é um dos biomas mais perturbados pela ocupação humana, visando, principalmente, à introdução de grandes monoculturas como a soja e o milho. Porém, a diversidade de espécies existentes nesse bioma e o seu potencial de utilização agrícola são quase que desconhecidos. Entre essas espécies destacam-se as espécies frutíferas.

As frutíferas do Cerrado são muito apreciadas pela população local. Possuem formas variadas, cores atrativas e sabores que lhes são característicos. Além disso, possuem elevado teor de açúcares, proteínas, vitaminas, sais minerais e seus produtos podem ser consumidos *in natura* ou parcialmente beneficiado, na forma de sucos, licores, doces, sorvetes, geléias etc.

As frutas nativas do Cerrado constituem-se, ainda, em uma importante fonte de alimentos para animais silvestres, que atuam como dispersores naturais de sementes e pólen. Em alguns casos, como ocorre com alguns invertebrados, há um processo de coevolução entre plantas e animais, garantindo a sobrevivência de ambos. Apesar da importância econômica das espécies do Cerrado, a exploração, especialmente das frutíferas nativas, é feita quase que exclusivamente de forma extrativista e predatória, colocando várias espécies sob o risco da extinção.

Vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de conhecer o potencial de utilização das frutíferas nativas do Cerrado como fonte geradora de recursos para as populações locais, principalmente na agricultura familiar. Para isso, tem se priorizado as regiões mais representativas em produção e as frutas de maior consumo regional.

No Cerrado brasileiro, o pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) destaca-se por sua importância nutricional, sendo a espécie frutífera de maior importância econômica. Após levantamentos feitos no CEASA-GO, Rosa (2004) realizou estudos nas cinco regiões mais representativas em produção de pequi no Estado de Goiás, adotando como critério para escolha dessas regiões, a produtividade e a densidade de plantas. A autora avaliou, entre outras variáveis, os

micronutrientes do solo, a disposição geográfica correlacionando-as com época de frutificação, produtividade das plantas e micronutrientes das folhas.

Rosa (2004) observou que, em cada região, o florescimento ocorre em períodos mais ou menos sincronizados, havendo uma tendência de maturação mais tardia à medida que aumenta a altitude e a latitude. A produção é maior em ambientes abertos pela ausência da competição por luz entre as plantas. A presença de cobre no solo, cálcio e boro nas folhas, contribuem com o aumento da produção e o teor de alumínio interfere negativamente na produção.

Uma vez que os recursos genéticos referentes às espécies frutíferas nativas estão seriamente ameaçados pela progressiva destruição de seus habitats naturais, surge também a necessidade de se encontrar um modo rápido e eficiente para se obter informações sobre a quantidade e a distribuição da variação genética, dentro e entre populações destas espécies. Para isso, o uso de marcadores moleculares torna-se uma opção viável para atingir esses objetivos, além de gerar importantes informações para um plano de conservação e manejo eficientes.

Os recentes avanços na área da biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para os estudos de biologia populacional. Atualmente, a variação encontrada em plantas ou animais pode ser analisada a nível de DNA. Pequenas diferenças nas seqüências gênicas podem ser observadas e descritas com um grau de precisão impraticável a pouco tempo atrás. Nesse contexto, os marcadores moleculares são utilizados como ferramentas capazes de fornecer subsídios para estudos que visem avaliar a extensão e a distribuição da variação entre as espécies como também, para investigar questões taxonômicas e evolutivas.

Os marcadores microssatélites apresentam alto nível de polimorfismo, são obtidos de qualquer tipo de tecido e em qualquer estágio do desenvolvimento. São reprodutíveis, de fácil transferência, codominantes e regularmente distribuídos pelo genoma em locos simples e conservados entre espécies do mesmo gênero, representando um importante avanço para os estudos genéticos relacionados às espécies nativas.

O polimorfismo apresentado pelos marcadores microssatélites são baseados nas diferenças de comprimentos das seqüências amplificadas, pois o número de repetições de um motivo em um loco de microssatélite é altamente variável. Portanto, as informações geradas por estes marcadores proporcionam suporte para futuros programas de conservação de germoplasma e melhoramento genético das espécies estudadas, inclusive

para o pequiizeiro, visando a sua domesticação e incorporação a sistemas produtivos regionais, a partir de estudos de diversidade genética, da biologia reprodutiva da espécie e da variabilidade existente entre e dentro de populações.

O objetivo geral deste estudo é contribuir para o programa de conservação e domesticação de espécies frutíferas nativas do Cerrado que vêm sendo desenvolvidos pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás.

As populações de piquizeiros utilizadas para o desenvolvimento deste estudo, doram as mesmas utilizadas por Rosa (2004), que pesquisou os ambientes de ocorrência e avaliou a produção do fruto dessas populações. O objetivo geral desse estudo foi verificar, utilizando marcadores moleculares microssatélites, se a diversidade genética de populações de piquizeiros está estruturada no espaço e os níveis dessa estruturação, entre e dentro de regiões, e entre e dentro das populações. O conjunto dessas informações irá contribuir para o programa de conservação e domesticação de espécies frutíferas nativas do Cerrado que vem sendo desenvolvido pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O Cerrado brasileiro é um dos mais importantes biomas do país. Contém muitos tipos fisionômicos de vegetação e alta biodiversidade. Nestas áreas encontram-se os maiores produtores de grãos e pecuaristas do país (Marques et al., 2002). O processo de antropização do Cerrado e o crescente desenvolvimento de técnicas agrícolas baseadas predominantemente em grandes monoculturas como soja, milho e gramíneas para pastagens, tem provocado intensas modificações nesse bioma.

Nas áreas naturais de cerrado ainda existentes, muito precisa ser feito no sentido de conhecer a diversidade faunística e florística desta parcela que ocupa cerca de 24% do território brasileiro (Naves, 1999). Os estudos devem ser dirigidos visando, especialmente, o potencial de utilização agrícola de algumas espécies frutíferas desse bioma.

O Cerrado produz muitos frutos que podem ser utilizados e consumidos de diversas maneiras pelas populações humanas. Porém, para que esses frutos possam ser produzidos em escala comercial, é preciso criar medidas que tornem suas culturas mais competitivas.

Apesar das frutíferas nativas serem potencialmente importantes para a economia regional, ainda não foram estabelecidas estratégias adequadas para cultivá-las. Na falta destas estratégias, a exploração destas espécies é feita de forma extrativista e predatória (Avidos & Ferreira, 2000). Embora existam leis de proteção à fauna e à flora, a exploração indiscriminada, especialmente de frutíferas nativas como o pequi, a cagaiteira, o araticunzeiro e a mangabeira, tem colocado muitas destas espécies sob o risco potencial de extinção.

Um fato bastante preocupante sobre as frutíferas dos cerrados consiste na ausência de classificações sistemáticas pelos pesquisadores para grande número de espécies (Avidos & Ferreira, 2000). Adicionalmente, o conhecimento acumulado sobre estas espécies, tanto do potencial frutífero quanto medicinal, ainda se encontra, predominantemente, sob domínio do conhecimento popular.

Entre as espécies frutíferas do cerrado brasileiro, o pequi merece destaque por sua importância nutricional. É também a espécie frutífera de maior importância econômica (Ribeiro et al., 1997). Porém, com a expansão acelerada da agricultura e da pecuária nas regiões de Cerrado nos últimos vinte anos, os pequizeiros vêm sendo derrubados de forma sistemática. Esse fato expõe a espécie ao risco de erosão do patrimônio genético, caso não sejam desenvolvidas técnicas de manejo que garantam a manutenção da variabilidade genética ainda existente nessas plantas.

## 2.1 EVOLUÇÃO E ADAPTAÇÃO DAS PLANTAS

Durante o processo evolutivo/adaptativo das plantas, ocorreu também o desenvolvimento de formas, cores e composições químicas distintas que garantiram a elas maior valor adaptativo, tornando-as mais atraentes para os animais, de modo que estes atuassem como dispersores naturais de suas sementes (Naves & Chaves, 2001). Segundo Guimarães Junior & Galetti (2001), os frutos pequenos, doces, vermelhos ou pretos geralmente são dispersos por aves, aqueles frutos que são grandes, aromáticos, amarelos, marrons ou verdes, tiveram a sua dispersão associada a mamíferos.

Na Costa Rica, Janzen & Martin (1982), citados por Guimarães Junior & Galetti (2001), observaram que vários frutos eram consumidos apenas por cavalos e bois e nos lugares aonde estes animais não chegavam esses frutos apodreciam sob a planta mãe. Isso levou os dois pesquisadores a sugerirem que esses frutos eram possivelmente dispersos pela megafauna extinta no final do Pleistoceno. Janzen & Martin denominaram esses frutos de anacrônicos, pois apresentavam características mais adaptadas ao passado do que ao presente.

Com o desaparecimento da megafauna, algumas plantas conseguiram se perpetuar por propagação vegetativa, outras conseguiram vencer a competição por água, nutrientes e luz sob a sombra de suas mães. As plantas que conseguiram vencer essa competição tiveram suas sementes dispersas possivelmente por animais domésticos ou exóticos introduzidos no país por ocasião de sua colonização (Guimarães Junior & Galetti, 2001). A coevolução entre animais e plantas está associada às características alimentícias dos frutos e se deu através de um processo lento e natural, por um longo período de tempo (Naves & Chaves, 2001).

Atualmente, alguns frutos anacrônicos são consumidos pelas populações humanas sul americanas, surgindo daí, a hipótese de que espécies como caju, cacau, pequi e algumas palmeiras tenham sido dispersas também pelo homem depois da extinção dos grandes mamíferos. Outras espécies, como o jatobá, passaram a contar com dispersores secundários, como alguns roedores (Guimarães Junior & Galetti, 2001).

A partir do momento que o homem começou a domesticar as plantas e os animais, iniciou-se também o desenvolvimento e aplicações de técnicas agropastoris, com objetivo único de suprir suas necessidades e garantir a sua sobrevivência e a de seu grupo. O processo de ocupação espacial pelas populações humanas deu início à fragmentação das florestas naturais. Essa fragmentação contribuiu de várias maneiras para a alteração da diversidade genética das populações naturais, modificando os padrões de dispersão de pólen e sementes (Foré et al., 1992).

Na região Centro-Oeste, a fundação de Brasília no ano de 1960, e a expansão rodoviária, populacional, imobiliária, pecuária e industrial, observadas nos anos de 1970, causaram mudanças radicais no Cerrado dessa região. Em 1987, o Brasil já contava com um rebanho bovino de cerca de 160 milhões de cabeças e aproximadamente 120 milhões de hectares de pastos inativos, com cerca de duas décadas de pastoreio (Haridasan, 1989).

Atualmente, os maiores produtores de grãos e pecuaristas encontram-se na região do Cerrado (Marques et al., 2002), mesmo assim, esse bioma ainda apresenta elevada biodiversidade. Entre os gêneros vegetais existentes, muitos deles, incluindo *Eugenia*, *Anacardium*, *Hancoria*, *Annona* e *Caryocar*, são utilizados como fonte de alimentação pela população local. Destacando-se aqui o gênero *Caryocar* cuja família Caryocaraceae possui elevada importância nutricional, social e econômica.

## 2.2 FAMÍLIA CARYOCARACEAE

A família Caryocaraceae possui apenas dois gêneros: *Anthodiscus*, com nove espécies, e o *Caryocar*, com dezesseis espécies, das quais doze ocorrem em território brasileiro. A espécie *Caryocar brasiliense* está dividida em duas subespécies, a subespécie *brasiliense* (Figura 1) de porte arbóreo e a subespécie *intermedium* (Figura 2) de porte subarbustivo ou arbustivo (Prance & Silva, 1973).



**Figura 1.** *Caryocar brasiliense* subespécie *brasiliense* (Planta jovem)  
(Fonte: Chaves, S.R., 2005)



**Figura 2.** *Caryocar brasiliense* subespécie *intermedium*  
(Fonte: Silva, D.B. et al., 2001)

O *C. brasiliense* pode ser encontrado nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Piauí, Tocantins, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, sendo a espécie frutífera de maior ocorrência no Brasil Central (Araújo, 2001).

A polpa do pequi é usada na alimentação humana, sendo um ingrediente tradicional na culinária regional, principalmente na região Centro-Oeste. Da polpa também se extrai o óleo de pequi, utilizado como condimento ou frituras (Silva, 1994). Da casca e das folhas extraem-se corantes amarelos que são empregados pelos tecelões em tinturarias caseiras (Almeida et al., 1998).

A unidade de dispersão do pequizeiro é o caroço. Devido à presença de inibidores para germinação na polpa e nos espinhos endocárpicos (Melo, 1993), sua germinação é demorada e desuniforme (Barradas, 1972).

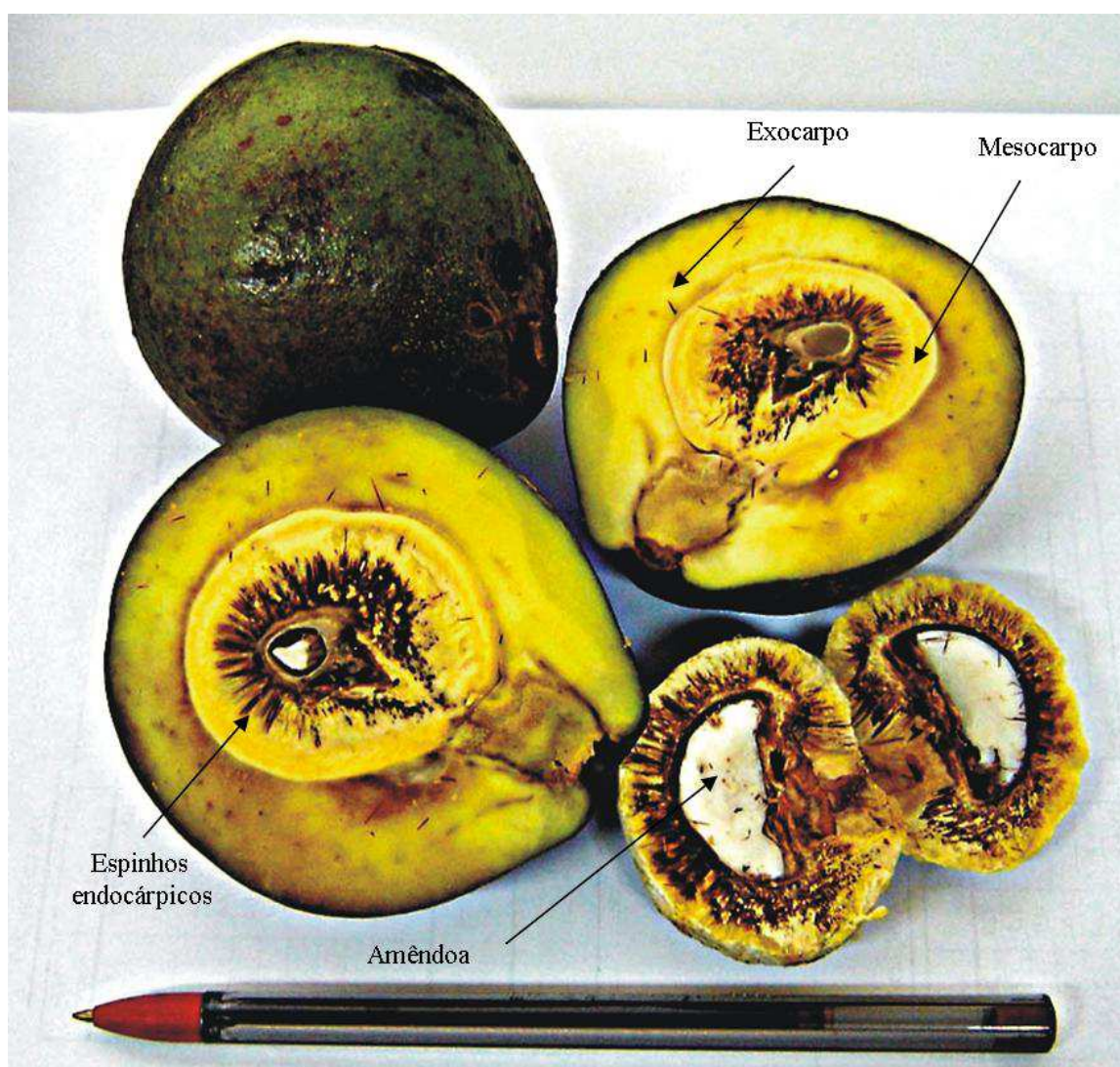
Os indivíduos adultos apresentam um tamanho médio de 3 metros, variando de cerca de um a dez metros podendo atingir quinze metros nos cerrados de Minas Gerais. Em Goiás, Naves (1999) encontrou pequizeiros que foram considerados adultos, variando de oitenta centímetros a nove metros e meio, com média de 3,19 metros de altura.

Por ser característica de Cerrado, o pequizeiro é uma planta semidecídua e ocorre em agrupamentos, possivelmente, agregados em regiões favoráveis para o seu desenvolvimento (Ribeiro, 1980). Durante a estação seca ocorre a queda parcial das folhas do pequizeiro, principalmente nos meses de junho e julho. O brotamento ocorre de julho a novembro (Gribel, 1986) e a floração ocorre logo após a emissão de folhas novas (Almeida et al., 1998).

Segundo Rosa (2004), nas cinco regiões do Estado de Goiás utilizadas para esse estudo, observou-se o florescimento do final do mês de junho até o início de novembro. Portanto, a época de produção dos pequizeiros é variável de acordo com os locais de ocorrência. Nos municípios de Mutunópolis e Estrela do Norte a produção é mais precoce (setembro), enquanto que as populações de Mambaí, Damianópolis e Alvorada do Norte têm produção mais tardia (janeiro).

O fruto do *C. brasiliense* é uma drupa (Figura 3), com cerca de 10 cm de diâmetro constituída de um exocarpo (casca) de cor verde acinzentada na parte externa e amarelada na parte interna, quando madura. Possui semente reniforme e

oleaginosa de cor branca, chamada de amêndoa, alojada em um endocarpo duro e lenhoso (Barradas, 1972), O mesocarpo (polpa) é amarelo claro, oleaginoso, carnoso, aromático e rico em tanino e envolve uma camada de espinhos endocárpicos finos e rígidos, com dois a cinco milímetros de comprimento (Santana, 2002). Segundo Almeida et al., (1998), o peso médio do fruto é de cerca de 120 g, o exocarpo representa cerca de 82% do fruto, o endocarpo 4,6%, o mesocarpo 7% e a amêndoa cerca de 1%.



**Figura 3.** Fruto do pequiizeiro. As setas indicam as partes do fruto: exocarpo, mesocarpo, endocarpo, espinhos endocárpicos e amêndoa (Fonte: Chaves, S. R. 2005)

A proporção de frutos formados por polinização cruzada é maior do que os que são formados por autopolinização (Gribel, 1986) e a ocorrência de elevada taxa de fecundação cruzada, caracteriza a espécie como alógama (Oliveira, 1998).

A variabilidade fenotípica encontrada envolve capacidade de produção, sabor da polpa, porte da planta, variações de tipos de fruto e número de sementes por fruto, que podem variar de um a quatro por fruto (Santana, 2002).

### 2.3 POTENCIAL ECONÔMICO DO PEQUIZEIRO

Das frutíferas nativas do Cerrado brasileiro, o pequizeiro é o que apresenta maior potencial econômico e social (Ribeiro et al., 1997). Dele é possível aproveitar praticamente tudo. A polpa do fruto é utilizada para produção de doces, licores e após o cozimento é consumida na culinária regional. A madeira de um modo geral é bastante resistente ao esmagamento e possui alta durabilidade, por isso é bastante utilizada na fabricação de estacas, pilares, mourões, pilões, na produção de móveis e também na construção civil. As folhas e a casca da madeira possuem propriedades medicinais.

Apesar das grandes vantagens econômicas e nutricionais proporcionadas pelo piquizeiro, pouco se conhece sobre a espécie. Algumas pragas, como a antracnose, foram registradas pela primeira vez no Brasil apenas em 2002 por Anjos et al., em estudos conduzidos em casa de vegetação, quando vinte plantas foram inoculadas e dezoito foram suscetíveis ao fungo *Colletotrichum acutatum* causador da antracnose do pequizeiro. Lopes et al., (2003) descreveram a presença de uma “lepidobroca” que se alimenta dos frutos do pequizeiro. Segundo esses autores a lagarta que mede aproximadamente 15 mm de comprimento, de coloração clara e cabeça pequena, penetra no fruto até a semente. Ainda dentro do fruto, depois de se alimentar, transforma-se em crisálida ou pupa, favorecendo a queda precoce do fruto e comprometendo o seu aproveitamento.

Em 1995, em um dos maiores centros de abastecimento do Estado, CEASA-GO, foram comercializados 902,3 toneladas de pequi durante os meses de janeiro a fevereiro e outubro a dezembro. Desse total 493,5 toneladas eram procedentes do Estado do Tocantins, 348,5 toneladas de Goiás e 25,1 toneladas de Minas Gerais e da Bahia (Couto et al., 2001). Em 2002, no mesmo centro de

abastecimento, foram comercializadas cerca de 2 mil toneladas de pequi em casca, vindos principalmente de São Miguel do Araguaia, Iporá, Santa Terezinha de Goiás e da região Nordeste do Estado.

Somente uma parte do pequi que é comercializado passa por essa via de escoamento. A maior parte da produção é movimentada pela economia informal, em feiras livres e por ambulantes, inclusive às margens das rodovias. As atividades comerciais relacionadas ao pequi contribuem com a sobrevivência de muitas famílias envolvidas, direta ou indiretamente. Essas atividades envolvem a coleta dos frutos, a produção de licores, óleos, sabão e outros derivados, bem como sua comercialização.

#### 2.4 UTILIZAÇÃO DO PEQUIZEIRO

A utilização do pequi na culinária regional é o meio mais comum de consumo dessa fruta, na preparação de pratos típicos, doces, licores e conservas (Heringer, 1970; Ribeiro, 1980). O chá da folha é usado como estimulante da bÍlis e também como regulador do fluxo menstrual e o óleo é utilizado para tratamento de doenças respiratórias (Almeida et al., 1998).

Estudos feitos por Khouri (2004), utilizando o extrato aquoso de polpa de pequi, por meio de teste de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos, mostraram que todas as culturas tratadas com extrato de pequi apresentaram menor número de metáfases em relação ao tratamento controle. Segundo a autora, esse comportamento é característico de substâncias antimutagênicas que atuam como inibidores de crescimento ou como indutores de apoptose celular. O extrato aquoso de pequi também mostrou propriedades antioxidantes, podendo ser um agente natural no combate aos radicais livres.

Por ser uma planta bem adaptada a regiões de baixa pluviosidade, existe a sugestão para cultivo desta espécie nas regiões secas do Nordeste no Cariri e sertões vizinhos de Pernambuco e Piauí (Braga, 2002). Segundo este autor, nos períodos de safra, várias pessoas de baixa renda destas regiões passariam a viver dos frutos do pequi. Porém, para que o pequi possa ser cultivado no Nordeste, algumas barreiras precisam ser vencidas, entre elas, está a exigência natural da planta por certa quantidade de água ou irrigação durante o seu

desenvolvimento inicial.

## 2.5 PERSPECTIVAS NA INDÚSTRIA QUÍMICA, FARMACÊUTICA E ALIMENTÍCIA

Vários estudos têm garantido um futuro promissor para a utilização do pequi. Extratos preparados a partir de folhas, botões florais e frutos de pequi começaram a ser avaliados quanto as suas atividades fúngicas. Passos et al., (2003), do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás, avaliaram as propriedades antifúngicas de compostos derivados da folha de *C. brasiliense*. Os resultados daquele estudo evidenciaram a inibição de 91,3% de isolados de *Cryptococos neofarms*. A elevada ocorrência de *Cryptococos*, principalmente em pacientes imunocomprometidos pelos efeitos colaterais das drogas disponíveis para tratamentos de micoses, tem incentivado os pesquisadores a procurarem novos agentes antimicóticos.

Efeitos fungitóxicos sobre fitopatógenos foram avaliados por Marques et al., (2002) a partir de extratos das folhas, botões florais e frutos, coletados de uma população nativa de pequi. O extrato metanólico do botão floral foi o que apresentou maior porcentagem de inibição na germinação do fungo *Fusarium oxysporum*.

O óleo que é produzido pelo pequi e sua aplicação nos diferentes mercados emergentes do país têm despertado a atenção dos pesquisadores. Paula et al., (2003) promoveram a caracterização dos óleos essenciais das folhas e frutos de *C. brasiliense* e constataram que as estações seca e chuvosa não influenciam na composição dos óleos essenciais do fruto, porém influenciam na quantidade destes óleos. Na investigação química para caracterização dos óleos fixos das sementes, obteve-se a predominância de cerca de 35% de ácido palmítico e aproximadamente 50% de ácido oléico. Nas folhas, em amostras coletadas durante a estação chuvosa, não foram obtidos óleos essenciais.

Estudos feitos por Facioli & Gonçalves (1998), visando a utilização do óleo de pequi como fonte alternativa ao uso da manteiga de cacau, demonstraram a composição dos ácidos graxos do óleo da polpa e da amêndoa do pequi. Neste estudo, verificou-se que a polpa e amêndoa do pequi são constituídos na sua maior

parte por ácido oléico e ácido palmítico, e pequena quantidade de ácido esteárico (Tabela 1), enquanto que a manteiga de cacau apresenta altos teores de ácidos oléico, palmítico e esteárico. Esta informação poderá dar suporte para futuros programas de melhoramento genético do pequi, com o objetivo de aumentar a concentração de ácido esteárico, viabilizando a utilização do óleo do fruto de pequi em substituição total ou parcial da manteiga de cacau.

**Tabela 1.** Composição em ácidos graxos de óleo de pequi e de manteiga de cacau

Ácido Graxo	Teor % (p/p)	
	Óleo de pequi	Manteiga de cacau
Palmítico	34,4	26,0
Esteárico	1,8	34,4
Oléico	57,4	34,8
Outros	6,4	4,8

Fonte: Faccioli & Gonçalves (1998), com modificações.

Visando os benefícios oferecidos pelo beneficiamento do pequi, já é evidente o interesse de alguns seguimentos empresariais em investir em equipamentos e tecnologias que permitam a retirada dos espinhos endocárpicos da polpa, garantindo com isso, o aproveitamento total do fruto. A retirada manual dos espinhos implica numa perda de aproximadamente 30% da polpa e compromete o aproveitamento da semente, que também tem valor comercial, podendo ser utilizada, por exemplo, para extração de óleo (Silva et al., 2004).

## 2.6 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA

Além da importância econômica e alimentícia do pequi para a espécie humana, ele também é indispensável como fonte de alimentação para os animais silvestres, destacando-se alguns vertebrados superiores como pássaros, roedores, tatus, canídeos, veados e, até mesmo, o gado (Naves & Chaves, 2001). Para os invertebrados, especialmente para alguns artrópodes, os pequizeiros servem como fonte de alimentação e abrigo. Algumas espécies de lepidópteros e himenópteros desenvolveram estratégias associadas a estas plantas, capazes de garantir a sobrevivência de ambas. Alguns insetos utilizam as estruturas reprodutivas do pequi como fonte de alimentação e geralmente têm esses recursos

sincronizados a seus ciclos de vida ou usam esses recursos de modo seqüencial ao seu desenvolvimento. Conseqüentemente, muitas destas espécies são especializadas a certas espécies botânicas, estabelecendo associações com estruturas particulares dessas plantas, como as flores e frutos que são mais nutritivos e menos protegidos. Estudos feitos por Diniz & Moraes (2002), verificaram que as larvas encontradas associadas às estruturas de *C. brasiliense* pertencem as famílias dos Notodontidae. Estes autores constataram também que estas larvas são especializadas a um só gênero de plantas.

Melo (2001) fez o levantamento das aves que visitam o pequizeiro na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) do Distrito Federal e verificou que as flores de *C. brasiliense* foram visitadas por treze espécies de aves. As aves nectarívoras concentraram suas visitas no final da manhã e à tarde. No início da manhã, as flores eram visitadas pelas aves insetívoras para se alimentar dos insetos que também se utilizam desse recurso alimentar.

Levando-se em consideração que no Cerrado brasileiro, das espécies pertencentes à família Cariocaraceae, há uma predominância da espécie *C. brasiliense*, pode-se perceber a importância desta espécie botânica para a família Notodontidae e outros artrópodes, bem como para as aves que utilizam desses recursos como alternativa de alimentação durante a seca.

## 2.7 CONSERVAÇÃO

Segundo Hay et al., (2000), uma espécie pode estar distribuída espacialmente de três formas: em escala macro (biogeografia), meso (comunidade) e micro (distribuição espacial dos indivíduos dentro da comunidade). A escala micro pode se distribuir no espaço sob as formas aleatória, agrupada ou uniforme. Quando estão sob a forma agrupada, os indivíduos geralmente estão agregados em regiões mais favoráveis do habitat. Entretanto, em situações de agrupamentos, a variação genética existente entre as populações vai sendo perdida gradativamente e passa a existir apenas dentro das populações.

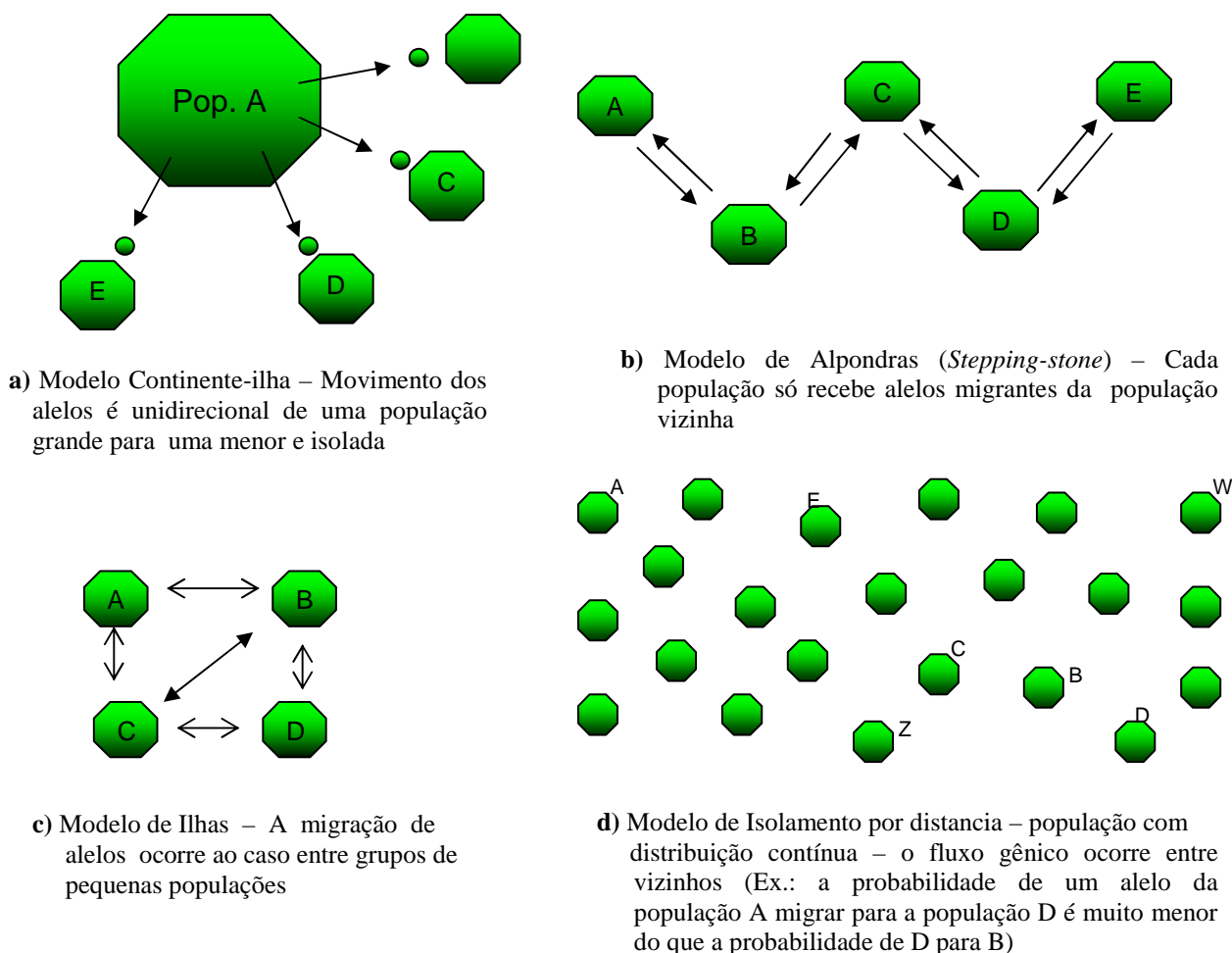
A variação genética existente entre duas populações pode ser mensurada a partir das diferenças alélicas por elas apresentadas. Qualquer população de tamanho finito

tende a tornar-se cada vez mais endogâmica e com o tempo, a proporção de heterozigotos irá diminuir em detrimento da proporção de homozigotos. A longo prazo, essas populações sofrerão os efeitos da deriva genética, processo de flutuação aleatória na frequência alélica que leva eventualmente a fixação ou a perda de alelos. A variação, que inicialmente existia entre as populações, salta para dentro das populações favorecendo a divergência entre elas. A curto prazo, essas populações sofreram os efeitos da depressão por endogamia, com os efeitos dos alelos deletérios que antes não se expressavam por estarem na condição de heterozigose na população (Futuyma, 1992).

A variação genética é fundamental para que haja evolução como produto da seleção natural. A estrutura genética de uma população resulta de fatores como, mutação, migração, seleção e deriva genética. A deriva geralmente ocorre devido a fatores casuais, principalmente em populações pequenas e isoladas, podendo levar uma população a uma elevada taxa de homozigose (Futuyma, 1992; Falconer, 1987). Conseqüentemente, a distribuição em agrupamentos ou sub-agrupamentos favorece o crescimento de diferentes níveis de endogamia.

Com o fluxo gênico comprometido, esses grupos acabam por se isolarem geograficamente e as diferenças genéticas encontradas entre as populações podem ser explicadas pela deriva genética (Futuyma, 1992). A dormência prolongada das sementes, também acaba por contribuir com a endogamia, causada pela sobreposição de gerações. Se o tamanho efetivo exigido para estas populações for grande, pode ter conseqüências desastrosas a médio e longo prazo, como o aumento na frequência de homozigotos e conseqüente redução na frequência de heterozigotos (Futuyma, 1992; Kageyama et al., 1998).

O fluxo gênico, caracterizado pelo processo migratório de alelos entre populações, também contribui para o modelo de estruturação na qual se encontra uma população. Assim, diferenças na estrutura de uma população permitem visualizar diferentes modelos de fluxo gênico: o modelo continente-ilha (Figura 4-A), modelo alpodras, (*Stepping-stone*) (Figura 4-B), modelo de ilhas (Figura 4-C) e o modelo de isolamento por distância (Figura 4-D). Por exemplo, no modelo de ilha, um migrante de A que vai para B faz com que B tenha  $N + m$  número de alelos. Quando uma população é pequena e recebe muitos migrantes de uma população grande, ela tende a assumir as características da população grande. Portanto, quanto menor for a população, maior será a chance dela perder a sua identidade, devido ao número de migrantes (Futuyma, 1992).



**Figura 4.** Diferentes modelos de fluxo gênico. A: Modelo continente-ilha; B: Modelo Alpondras; C: Modelo de ilha; D: Modelo de isolamento por distância

## 2.8 MARCADORES MOLECULARES E SEU USO EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA

O sucesso de qualquer programa de melhoramento ou de conservação é dependente do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse. Tradicionalmente, utiliza-se uma combinação de caracteres morfológicos e agrônômicos para a medição da diversidade genética em determinada população de indivíduos. Porém, estes caracteres apresentam uma grande dificuldade na identificação de grupos taxonômicos discretos, não permitindo identificar similaridades genéticas entre tais grupos.

Estas dificuldades devem-se ao fato da grande maioria dos caracteres vegetais serem influenciados por fatores ambientais, exibindo variação contínua e um alto grau de

plasticidade fenotípica. Para tentar solucionar estes problemas as técnicas moleculares têm sido utilizadas para monitorar a variabilidade genética (Parker et al., 1998).

As variações de forma e função dos organismos possuem em maior ou menor escala, um componente genético. Portanto, a diversidade biológica pode ser avaliada pelas variações nas seqüências de DNA. São várias as técnicas disponíveis para analisar as diferenças entre seqüências de DNA. Os locos analisados por estas técnicas constituem-se em marcas, pontos de referência no genoma, que ao serem detectados por técnicas moleculares, são geralmente conhecidas como locos de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Os dados obtidos com estes marcadores são utilizados para conhecer a natureza da variabilidade genética de indivíduos ou populações. Tais técnicas também são utilizadas para dar suporte ao uso eficiente desta variabilidade em programas de melhoramento (Beckmann, 1991).

O conteúdo informativo de uma técnica é alto quando ela permite a análise de vários locos ao mesmo tempo e quando em uma única reação, a proporção de locos polimórficos também for alta. Por outro lado, a acessibilidade da técnica é garantida quando o custo, a rapidez e o trabalho envolvido na obtenção dos dados é baixo.

Em geral, as estimativas dos parâmetros genéticos de diversidade genética em uma amostra populacional baseiam-se em dois níveis de variação: o número de formas alternativas de uma seqüência (alelos) e a freqüência destes alelos na população. Com base nestas estimativas, diferentes parâmetros podem ser estimados, o que possibilita uma maior compreensão da diversidade de uma população ou de populações (Karp et al., 1996).

A introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas, no início dos anos 60, deu início à era dos marcadores moleculares e ampliou o número de marcadores que poderiam ser utilizados. Esta técnica baseia-se em mutações no código genético, as quais alteram a carga elétrica de algumas proteínas com função enzimática. Após eletroforese das amostras de proteína, o polimorfismo é detectado por meio da visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. Os marcadores isoenzimáticos podem ser obtidos de uma maneira relativamente rápida, barata e estão disponíveis para praticamente todas as espécies de plantas. Conseqüentemente, a utilização de isoenzimas permitiu a detecção de polimorfismo entre plantas que não mostravam diferenças morfológicas, tornando possível uma melhor avaliação da variação genética existente (Torggler et al., 1995).

O poder de detecção da variabilidade existente diretamente ao nível do DNA foi alcançada com o desenvolvimento de técnicas em biologia molecular. A primeira delas baseia-se na ação de enzimas de restrição, as quais reconhecem uma seqüência de DNA e clivam a molécula nestes sítios específicos. Os efeitos de mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos nos sítios de clivagem, são detectados pelos diferentes tamanhos de fragmentos (polimorfismo) gerados após a digestão com uma enzima de restrição. Esta variação encontrada entre indivíduos foi denominada RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Botstein et al., 1980).

O desenvolvimento das técnicas de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis & Faloona, 1987), permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular, facilitando muito os trabalhos desenvolvidos no laboratório e abrindo novas e inúmeras possibilidades de utilização do polimorfismo encontrado na molécula de DNA. Entre as técnicas desenvolvidas destaca-se o surgimento dos marcadores microssatélites.

Marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), são seqüências simples de nucleotídeos, compostas de um a seis pares de bases, formando longas unidades repetidas e amplamente distribuídas pelo genoma, tanto de procariotos como de eucariotos. Estas seqüências curtas de DNA repetitivo formam várias combinações entre as quatro bases do DNA - adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T) - repetidas várias vezes de maneira idêntica e adjacente (repetição em tandem). As seqüências de DNA que flanqueiam microssatélites são conservadas, o que permite a seleção de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica, denominados *primers*, de 20 a 30 pares de bases, e sua amplificação via PCR.

Microssatélites foram identificados em uma grande variedade de espécies, incluindo mamíferos (Love et al., 1990; Moore et al., 1991; Beckmann & Weber, 1992), pássaros (Moran 1993; Burt et al., 1995), peixes (Estoup et al., 1993; Rico et al., 1996), e insetos e levedura (Tautz & Renz, 1984).

A maioria do conhecimento a respeito dos microssatélites foram obtidos a partir do reino animal, principalmente de mamíferos. Em humanos, foi mostrado que a repetição  $(AC)_n$ , presente em aproximadamente  $5 \times 10^4$  locos por genoma haplóide, é um dos motivos mais comuns (Hamada et al., 1984; Moore et al., 1991), enquanto todas as repetições de três ou quatro nucleotídeos foram estimados em aproximadamente  $4 \times 10^5$

locos (Edwards et al., 1991).

Em plantas, a presença da repetição (AC)<sub>n</sub> e (AG)<sub>n</sub> foi descrita pela primeira vez por Condit & Hubbell (1991). A procura por microssatélites em bancos de dados de DNA de espécies de plantas, indicam que a repetição (AC)<sub>n</sub> geralmente é menos freqüente do que em mamíferos, sendo o motivo (AT)<sub>n</sub> o mais encontrado, seguido por (A)<sub>n</sub> e (AG)<sub>n</sub>.

Repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos também estavam presentes nos genomas de plantas, sendo os motivos mais freqüentes (AAT)<sub>n</sub>, (AAC)<sub>n</sub>, (AGC)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub>, (AATT)<sub>n</sub>, (AAAT)<sub>n</sub> (Akkaya et al., 1995; Lagercrantz et al., 1993; Morgante & Olivieri 1993; Wang et al., 1994). Uma grande variação na abundância destes motivos foram observadas em várias espécies. Por exemplo, (CCG)<sub>n</sub> é abundante em arroz (Zhao & Kochert, 1993) mas pouco representado em outras espécies de plantas superiores (Lagercrantz et al., 1993; Wang et al., 1994).

Baseado na pesquisa em bibliotecas genômicas de outras plantas, a freqüência de (AC)<sub>n</sub> está disponível para trigo em um sítio a cada 700 kb (Redoña & Mackill, 1996), no milho, um sítio a cada 100-1000 kb (Condit & Hubbell, 1991), e no *Arabidopsis*, um sítio a cada 430 kb (Bell & Ecker, 1994). Em contraste com mamíferos, a freqüência observada de (GA)<sub>n</sub> em plantas é consistentemente maior do que (AC)<sub>n</sub> (Condit & Hubbell, 1991; Morgante & Olivieri, 1993; Wang et al., 1994).

Como outras classes de DNA repetitivo, os microssatélites possuem altas taxas de mutação, numa faixa entre  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  por loco, por gameta e por geração. Esta instabilidade surge por um mecanismo específico de mutação chamado “deslizamento” (*slippage*) (Tautz & Schlötterer, 1994). Experimentos *in vitro* (Schlötterer & Tautz, 1992) assim como estudos em microssatélites clonados (Hentschel, 1982) demonstraram que não é necessária a presença de enzimas para o deslizamento do DNA, indicando a intrínseca instabilidade do próprio microssatélite. Devido à sua natureza repetitiva, as duas fitas do DNA podem deslizar uma sobre a outra e realinhar-se de uma nova maneira. Quando este fenômeno ocorre durante a síntese de DNA, o resultado é o ganho ou a perda de uma ou mais unidades de repetição.

A maioria das inserções e deleções que ocorrem durante o deslizamento é corrigida pelo sistema de reparo e somente uma pequena fração não corrigida é detectada como uma mutação no microssatélite (Eissen, 1999). As taxas de mutação dos microssatélites são influenciadas por diversos fatores, dos quais o número de repetições é o mais caracterizado (Schlötterer et al., 1998). Em uma grande variedade de organismos, como

levedura, *Drosophila* e humanos, foi demonstrado que as taxas de mutação dos microssatélites estavam positivamente correlacionadas com o número de repetições (Jin et al., 1996; Wierdl et al., 1997; Schlötterer et al., 1998).

Os microssatélites são marcadores codominantes gerando dados similares àqueles gerados por isoenzimas, porém com um número de alelos e uma heterozigidade muito maior. Devido ao alto grau de polimorfismo, os microssatélites tornaram-se os marcadores ideais para o mapeamento genético e estudos populacionais, sendo empregados com sucesso na demonstração de tipos verdadeiros entre acessos e cultivares de bancos de germoplasma, detectando duplicações, mistura de sementes, deriva, e cruzamentos não controlados (Olufowote et al., 1997). Também foram empregados na determinação do grau de parentesco entre indivíduos (Yang et al., 1994), no esclarecimento da estrutura genética ou da divisão da variação entre indivíduos, populações e espécies (White et al., 1999; Dayanandan et al., 1999; Collevatti et al., 2001), além de possibilitar a construção de mapas genéticos (Wu & Tanksley, 1993; Bell & Ecker, 1994; Akkaya et al., 1995; Cregan et al., 1999).

A transferibilidade dos locos de microssatélites entre espécies relacionadas, deve-se a homologia de regiões que flanqueiam as seqüências de repetições simples. Os dez microssatélites desenvolvidos para *C. brasiliense* Camb. tiveram transferibilidade absoluta (100%) para cinco outras espécies do gênero: *C. coriaceum*, *C. edule*, *C. glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosum*, indicando homologia dos genomas e permitindo estudos comparativos da estrutura genética destas populações (Collevatti et al., 1999).

## 2.9 ANÁLISES DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

### 2.9.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de Wright

A genética de populações foi desenvolvida como se os genes fossem entidades isoladas, sendo esse o método mais eficiente de tratá-los. Utilizando-se apenas um ou dois locos é possível compreender e explicar uma pequena parte da variação existente nas populações naturais. Em um indivíduo diplóide, quando se avalia apenas um loco com dois alelos, cujo padrão de herança obedece as leis de Mendel, obtém-se a proporção de 3:1 de classes fenotípicas e 1:2:1 de classes genotípicas. No entanto, quando se avaliam dois locos, teremos 9:3:3:1 de fenótipos e 1:2:2:4:1:2:1:2:1 de genótipos. Isso demonstra que,

de acordo com o número de locos avaliados, cresce o grau de complexidade da análise e ela se torna impraticável (Falconer, 1987; Futuyma, 1992; Griffiths et al., 1998).

Atualmente, com o desenvolvimento de alguns recursos computacionais é possível avaliar os diferentes níveis de estruturação de uma população, utilizando simultaneamente vários “locos de marcadores”. Um exemplo disso são as avaliações feitas utilizando-se marcadores moleculares.

Para descrever a constituição de uma população em relação a um dado loco é necessário especificar quais são as proporções de cada genótipo (as frequências genotípicas), bem como, a constituição genética em relação aos alelos que são transmitidos de geração a geração (frequências gênicas ou alélicas) (Falconer, 1987).

O comportamento reprodutivo da espécie assim como o tamanho da população, influenciam diretamente nas frequências gênicas e genotípicas de uma população. O fato da população ser panmítica garante a todos os indivíduos, a mesma probabilidade de cruzar-se com qualquer outro. Portanto, as frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes no decorrer das gerações. Esta constância é conhecida como equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As condições necessárias para que ocorra esse equilíbrio são: (1) a população seja “muito grande”, panmítica. Pois, na condição finita o acaso atua diretamente alterando estas frequências ao longo das gerações (Falconer, 1987; Futuyma, 1992), (2) não sofra efeitos de nenhum processo evolutivo sistemático como: mutação, seleção, migração e nem deriva genética, que é um processo evolutivo dispersivo (Falconer, 1987).

Considere-se um loco com dois alelos ( $A_1$  e  $A_2$ ) e uma população com  $N$  indivíduos diplóides, na qual as frequências relativas dos indivíduos homozigóticos dominantes ( $A_1 A_1$ ), recessivos ( $A_2 A_2$ ) e dos indivíduos heterozigóticos ( $A_1 A_2$ ) sejam  $P$ ,  $Q$  e  $H$ , respectivamente, em que  $P + H + Q = 1$ . Como os  $N$  indivíduos têm conjuntamente  $2N$  alelos, tem-se que a frequência gênica relativa de  $A_1$  é igual a  $(1/2)(2P + H) = f(A_1) = p$  e a de  $A_2$  igual a  $(1/2)(2Q + H) = f(A_2) = 1 - p = q$ , sendo portanto  $p + q = 1$ . Os valores  $P$ ,  $Q$  e  $H$ , constituem as frequências genotípicas relativas, enquanto  $p$  e  $q$  representam as frequências gênicas ou alélicas.

Sob condições de panmixia, ou seja, em populações teoricamente infinitas, cujos indivíduos se cruzam aleatoriamente e onde não existam mecanismos que alterem as

freqüências gênicas, ocorre o chamado equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nesse equilíbrio,  $P = p^2$ ,  $Q = q^2$  e  $H = 2pq$ , e a taxa de autofecundação natural ( $s$ ) é nula.

Várias são as situações que podem levar a população a desviar-se da condição preconizada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Um deles é o sistema reprodutivo da espécie. Quando há cruzamento entre indivíduos aparentados ocorre à endogamia, que pode ser medida pelo índice de fixação “ $f$ ” (Wright, 1922). Mesmo em espécies alógamas, o equilíbrio de Hardy-Weinberg deixa de existir se houver cruzamentos endogâmicos ou preferenciais entre indivíduos, caracterizando assim uma estruturação dentro da população.

Em populações naturais quando o índice de fixação difere de zero ( $f \neq 0$ ), podem ocorrer desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mesmo sob esta circunstância, a população pode atingir outro estado de equilíbrio, denominado Equilíbrio de Wright, ou equilíbrio com endogamia e as freqüências de  $p^2$ ,  $2pq$ , e  $q^2$  esperadas sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, passam a obedecer ao modelo de equilíbrio de Wright com  $P = p^2 + fpq$ ;  $Q = q^2 + fpq$  e  $H = 2pq(1-f)$  e as freqüências dos alelos passam a ser:  $p^2 + fpq + (1/2)(2pq)(1-f) = p$  e  $q^2 + fpq + (1/2)(2pq)(1-f) = q$  (Falconer, 1987; Futuyma, 1992).

### 2.9.2 Estatísticas F de Wright

As estatísticas F de Wright, permitem descrever a forma na qual as populações estão estruturadas, visando uma estruturação hierárquica: Neste caso, considera-se a população como um todo (T), as suas subdivisões (S) e o indivíduo (I). Para isso, são definidos os seguintes parâmetros:

- $F_{IT}$ : a correlação entre gametas que se unem para formar os indivíduos. É um parâmetro que permite avaliar se a endogamia total é resultante do sistema reprodutivo da espécie.
- $F_{IS}$ : é a correlação entre gametas dentro de cada subdivisão, considerando todas as subdivisões. É o índice de fixação ou coeficiente médio de endogamia intrapopulacional, devido ao sistema reprodutivo.
- $F_{ST}$ : é a medida da distância genética entre as populações estudadas, a correlação entre gametas aleatórios dentro das subdivisões, relativa aos gametas da população inteira. Permite verificar o índice de fixação ou coeficiente de endogamia entre as

populações que são atribuídos a subdivisão.

As estatísticas  $F$  de Wright (1965) são estimadas do seguinte modo:  $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$ , sendo o grau de endogamia dentro da população expresso como  $F_{IS} = (F_{IT} - F_{ST})/(1 - F_{ST})$ . O  $F_{IT}$  de Wright é uma estimativa que permite a correlação entre alelos dentro de indivíduos em todas as populações. É o coeficiente de endogamia que se refere aos indivíduos em relação ao conjunto de populações, ou ainda, o coeficiente médio de endogamia de todos os indivíduos nas populações analisadas.

O  $F_{ST}$  de Wright é a correlação dos alelos dentro de indivíduos na mesma população e o  $F_{IS}$  de Wright é a correlação dos alelos dentro de indivíduos dentro das populações. Além de poder ser interpretada como correlações e probabilidades, as estatísticas  $F$  de Wright, podem ser consideradas como quantidades relativas de heterozigosidades dentro das populações em relação à heterozigosidade populacional total (Wright, 1965).

Verificada a presença do equilíbrio com endogamia, a taxa de cruzamento aparente pode ser obtida a partir de  $F_{IS}$  pela expressão  $t_a = (1 - F_{IS})/(1 + F_{IS})$ , para cada loco avaliado, em que  $F_{IS} = 1 - (H/h)$ . A heterozigosidade observada  $H = H_o$  é a soma das frequências dos indivíduos heterozigotos e a heterozigosidade esperada  $h = H_e$ , calculada com base nas frequências alélicas.

### 2.9.3 Estimativas de diversidade genética

A taxa de fluxo gênico também pode ser avaliada, com base em  $F_{ST}$  por meio da equação  $\hat{N}m = [(1 - F_{ST})/(4 \times F_{ST})]$  onde,  $N$  é o tamanho populacional,  $m$  é a taxa de fluxo gênico e  $F_{ST}$  é a diversidade genética entre populações.

A diversidade genética de Nei (1972) e a análise de variância das frequências alélicas de Cockerham (1969), partem do pressuposto de que as populações são originadas de uma população ancestral comum, permitindo assim a estimativa de coeficiente de parentesco e a estimativa da divergência. Outra suposição é a de que a deriva genética e o sistema reprodutivo apresentado pela espécie são os responsáveis pelos desvios da panmixia.

Assim como as estatísticas  $F$  de Wright, as análises das frequências alélicas fornecem informações importantes sobre os níveis de fixação média de alelos dentro das populações ( $f$ ), no total das populações ( $F$ ) e a divergência genética entre as populações

( $\theta$ ). O  $F_{ST}$  de Wright, similar ao coeficiente de coancestria ( $\theta_P$ ) de Cockerham é a correlação dos alelos dentro de indivíduos na mesma população. O  $F_{IT}$  de Wright é similar ao  $F$  de Cockerham, cujas estimativas permitem a correlação entre alelos dentro de indivíduos em todas as populações e o  $F_{IS}$  de Wright é similar ao  $f$  de Cockerham, sendo a correlação dos alelos dentro de indivíduos dentro das populações (Wright, 1965).

A diversidade genética intrapopulacional é analisada pela heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), segundo o modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco. A heterozigosidade observada pode ser obtida por  $H_o = 1 - \sum p_{ii}$  em que, ( $p_{ii}$ ) é a frequência dos genótipos homozigotos. A diversidade gênica é dada pela heterozigosidade esperada por:  $H_e = 1 - \sum p_i^2$ , em que  $p_i$  é frequência alélica estimada do  $i$ -ésimo alelo.

#### 2.9.4 Estimativas de $R_{ST}$

Slatkin (1995) propôs uma nova medida de diversidade ( $R_{ST}$ ) para avaliar a diferença entre populações, que é função das diferenças entre tamanhos de alelos microssatélites. A estatística  $R_{ST}$  é uma medida de diversidade genética entre populações, que considera o modelo de mutações aos saltos (*Stepwise mutation model*) (Kimura & Ohta, 1978), no qual os alelos podem ser idênticos em estado. No modelo de mutações *stepwise*, cada mutação gera um alelo pela adição ou subtração de uma unidade de repetição do microssatélites. Portanto, alelos com tamanhos muito diferentes seriam menos relacionados do que alelos com tamanhos similares, e nesse caso admite-se a homoplasia, alelos idênticos por estado, mas não por descendência.

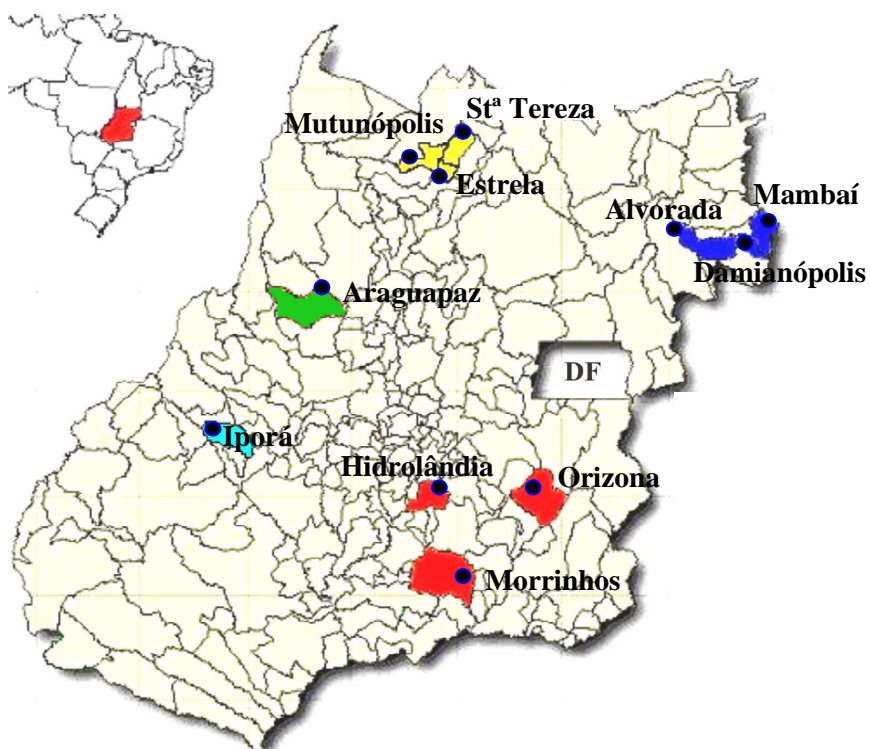
$F_{ST}$  é uma medida análoga ao  $R_{ST}$ , porém para dados de microssatélites provenientes de um só loco, admitindo-se o modelo de alelos infinitos (*Infinite allele model*) (Kimura & Crow, 1964). E um dado loco será considerado o mesmo em dois indivíduos se, e somente se, nenhuma mutação tenha ocorrido, nesse caso, os alelos idênticos possuem o mesmo ancestral e são idênticos por descendência.

Os modelos de alelos infinitos e o modelo de *stepwise*, representam dois modelos extremos, embora, proporcionem resultados similares desde que a fração total de identidades entre alelos seja alta. Apesar disso, a homoplasia é compensada pela alta variabilidade dos marcadores microssatélites. O grande desafio é saber, como e em que velocidade, ocorrem as mutações em microssatélites.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE DE COLETA

As coletas foram efetuadas nos municípios de Morrinhos, Hidrolândia, Orizona, Mambai, Damianópolis, Alvorada do Norte, Mutunópolis, Estrela do Norte, Santa Tereza de Goiás, Araguapaz e Iporá. Na Figura 5 podem ser observadas as localizações geográficas dos municípios. A Tabela 3, inclui algumas informações adicionais, tais como: altitude, temperatura média, umidade relativa e precipitação anual nos municípios, segundo dados coletados por Rosa (2004). Os dados meteorológicos foram obtidos da média de 30 anos (1961 a 1990), fornecidos pelo INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) para as sedes dos municípios. As coordenadas geográficas das localidades de coleta podem ser observadas na Tabela 2 e foram obtidas mediante o uso de um aparelho GPS (*Global Position System*).



**Figura 5.** Localização geográfica dos municípios onde foram realizadas as coletas de folhas de *Caryocar brasiliense*

**Tabela 2.** Municípios onde foram realizadas as coletas de folhas de pequi, (A) – altitude média; ( $t_m$ /dia) – temperatura média; (UR) – média da umidade relativa do ar; (Pr) – precipitação média anual; (LS) – Latitude Sul; (LO) – Longitude Oeste e predominância do ambiente de coleta, utilizadas para este estudo.

Regiões	Mun	A (m)	$t_m$ /dia (°C)	UR (%)	Pr (mm)	LS	LO	Ambiente
Sudeste/ Sul	Mor	637	21,5	67,5	1700	13°39'36"	48°48'37"	Aberto/Pastagem
	Hid	749	22,5	67,5	1900	13°37'49"	49°13'32"	Aberto/Pastagem
	Ori	763	21,5	67,5	1900	13°49'58"	49°08'28"	Fechado/Reserva
Nordeste	Mam	680	23,5	64,5	1500	15°17'58"	50°26'27"	Aberto/Pastagem
	Dam	780	23,5	64,5	1500	15°14'44"	50°30'21"	Fechado/Reserva
	Alv	517	23,5	64,5	1500	15°28'44"	50°24'11"	Fechado/Reserva
Norte	Mut	382	23,5	70,5	1700	16°29'55"	51°02'14"	Fechado/Reserva
	Est	389	24,5	70,5	1700	16°34'04"	50°59'12"	Aberto/Pastagem
	Ster	415	25,1	70,5	1700	16°50'26"	50°38'44"	Fechado/Reserva
Noroeste	Arag	360	24,5	70,5	1700	16°57'35"	49°10'53"	Aberto/Pastagem
Sudoeste	Ipor	449	23,5	70,5	1700	14°32'05"	46°05'36"	Aberto/Pastagem

Fonte: Rosa (2004) – com modificações

Os municípios de Damianópolis, Orizona e Hidrolândia apresentaram as altitudes mais elevadas, com 780, 763 e 749 metros, respectivamente. As altitudes mais baixas estão nos municípios de Estrela do Norte com 389 metros, Mutunópolis com 382 metros e Araguapaz com 360 metros. Os municípios de Mambaí, Alvorada do Norte e Damianópolis apresentaram os níveis mais baixos de precipitação média anual com 1.500 milímetros enquanto que, os mais altos níveis foram obtidas nos municípios de Hidrolândia e Orizona com 1.900 milímetros. Nos demais municípios a precipitação média anual foi de 1.700 milímetros.

### 3.2 MATERIAL VEGETAL

O material utilizado para esse estudo foi procedente de cinco regiões representativas em produção de pequi no Estado de Goiás. Nas cinco regiões escolhidas

foram selecionadas onze áreas distantes das cidades e de estradas muito movimentadas. Em cada uma delas selecionaram-se trinta indivíduos dos quais foram coletadas folhas jovens que foram armazenadas em tubos plásticos de 50 mL, mantidos no gelo durante todo o período de transporte até o Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Goiás, onde foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As coletas foram realizadas durante os meses de outubro de 2003 à janeiro de 2004, nas regiões Sudeste/Sul, Nordeste, Norte, Noroeste e Sudoeste do Estado de Goiás.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração de DNA foi utilizado o método CTAB (*Mixed Alkyltrimethyl-Ammonium Bromide*) de acordo com Ferreira & Grattapaglia (1996) com modificações. Foram utilizados 80 mg de tecido foliar triturado com nitrogênio líquido diretamente em microtubos de 1,5 mL. As amostras de DNA foram diluídas em TE (Tris HCl 1,0 M pH 8,0; EDTA 0,5 M) e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.1 Marcadores microsatélites

Para amplificação dos marcadores microsatélites as reações foram preparadas com volume final de 16  $\mu\text{l}$  contendo 10 ng de DNA; tampão da enzima 1X; 0,4  $\mu\text{M}$  de Mix dNTPs: (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 0,4  $\mu\text{M}$  de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 3,4 mM  $\text{MgCl}_2$  (microsatélites *Cb3*, *Cb11* e *Cb20*) a 2,8 mM de  $\text{MgCl}_2$  (para os demais) e uma unidade de Taq DNA polimerase.

Foram utilizados apenas oito dos dez pares de *primers* desenvolvidos por Collevatti et al., (1999) para *C. brasiliense*. O microsatélite *Cb12* não foi utilizado por apresentar um padrão de bandas de difícil genotipagem e o *Cb 23* por apresentar dificuldade de otimização da reação de modo a permitir a resolução dos fragmentos amplificados em géis de poliacrilamida a 6%.

As amplificações foram conduzidas nos termocicladores *MyCycler Thermal Cycler System* (*Life Science Group Bio-Rad Laboratories, Inc.*) programados inicialmente conforme Collevatti et al., (1999) (Tabela 3).

As genotipagens dos géis foram feitas utilizando-se recursos dos softwares ImageMaster<sup>®</sup> Totalab1.0 (*Amersham Pharmacia Biotech AB 1989-*

1999), do Adobe photoshop5.0<sup>©</sup> (Adobe Systems Incorporated Copyright<sup>©</sup> 1989-1998) e do CorelDraw11<sup>©</sup> (Corel Corporation, 2002) de acordo com o peso molecular das bandas, tendo como padrão um DNA Ladder 10 pb (Invitrogen-Life Biotecnology).

**Tabela 3.** Programação inicial para amplificação dos locos de microssatélites em pequi.

Passos	Temperatura (° C)	Tempo (minutos)
1	96	2
2	94	1
3	54 ou 56 dependendo do microssatélite	1
4	72	1
5	Voltar ao passo 2	+ 30 ciclos
6	72	7
7	15	∞
8	End	

### 3.3.2 Otimização dos locos microssatélites em pequizeiro

Para otimizar a resolução dos fragmentos amplificados, houve necessidade de aumentar ou diminuir a temperatura de anelamento dos *primers* desenvolvidos por Collevatti et al., (1999), bem como a concentração de cloreto de magnésio na amplificação de alguns microssatélites (Tabela 4). Dentre os dez pares de *primers* testados, apenas os microssatélites *Cb12* e *Cb23* não foram utilizados neste estudo. Para o *Cb12* houve dificuldades no processo de amplificação, possivelmente, por se tratar de um microssatélite imperfeito e o *Cb23* por apresentar um padrão de bandas de difícil genotipagem.

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir da leitura dos dados nos géis foram obtidas as frequências alélicas e genotípicas em cada loco. Estas frequências foram submetidas a um teste de aderência mediante o teste exato, feito pelo método convencional de Monte Carlo, às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme definido por Weir (1996), utilizando o software TFGA (Miller, 1997).

**Tabela 4.** Temperaturas de anelamento ( $T_a$ ), concentração de cloreto de magnésio [ ], microssatélites (SSR), que apresentaram melhor resolução para genotipagem dos indivíduos em gel desnaturante de poliacrilamida 6%

SSR	$T_a$ final	[MgCl <sub>2</sub> ] final	SSR	$T_a$ final	[MgCl <sub>2</sub> ] final
<i>Cb1</i>	55,0° C	2,8 mM	<i>Cb9</i>	57,0° C	2,8 mM
<i>Cb3</i>	54,0° C	3,4 mM	<i>Cb11</i>	53,5° C	3,4 mM
<i>Cb5</i>	55,0° C	2,8 mM	<i>Cb13</i>	50,5° C	2,8 mM
<i>Cb6</i>	57,0° C	2,8 mM	<i>Cb20</i>	53,5° C	3,4 mM

A diversidade genética e as estatísticas  $F$  de Wright foram estimadas sob modelo aleatório de acordo com Weir (1996), em que as populações amostradas são consideradas como representativas da espécie e com uma história evolutiva comum. As frequências alélicas, o número de alelos por loco ( $A$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e as estatísticas  $F$  de Wright ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  e  $F_{IT}$ ), foram estimadas utilizando o software GDA (Lewis & Zaykin, 2001). O fluxo gênico foi determinado pelo procedimento de Barton & Slatkin (1986), por meio das frequências alélicas obtidas de microssatélites. Os valores de fluxo gênico foram estimados utilizando-se a seguinte fórmula:  $\hat{Nm} = [(1-F_{ST})/4x F_{ST}]$  em que  $F_{ST}$  é a diversidade genética entre populações.

A estruturação da variabilidade foi visualizada em dendrograma construído a partir da matriz de distâncias genéticas de Nei e pelo critério de agrupamento UPGMA utilizando-se o software NTSYS (Rohlf, 2000). A estabilidade dos agrupamentos também foram testadas pelo procedimento de reamostragem por 10.000 *bootstraps* utilizando o software BOOD-3.03 (Coelho, 2000).

Com a finalidade de analisar os padrões de variação espacial, foi obtida estimativa do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) entre matrizes de distâncias genéticas de Nei e de distâncias geográficas entre as populações. A significância desta correlação matricial foi testada pela estatística  $Z$  de Mantel, utilizando 9999 permutações aleatórias utilizando o software TFPGA (Miller, 1997).

Para verificar se o número de indivíduos utilizado para este estudo seria suficiente para as inferências estatísticas, o tamanho efetivo populacional  $\hat{N}_e$  foi estimado de acordo com Vencovsky (1997) por  $\hat{N}_e = n/(1+f)$ , em que  $n$  é o tamanho amostral e  $f$  é o índice de fixação para cada população.

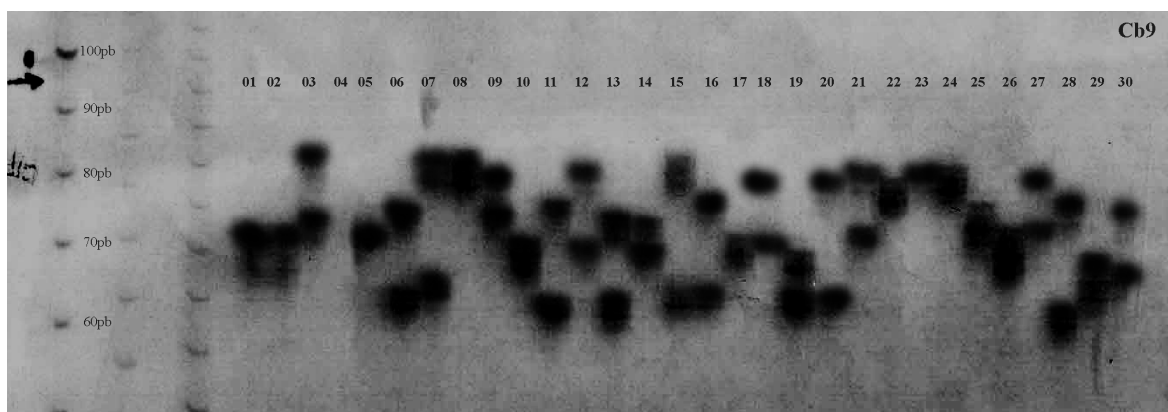
Em locos de microssatélites, o processo mutacional não está de acordo com o que se admite no modelo de alelos infinitos com baixas taxas de mutação. Por essa razão, foi utilizada, além da estatística  $F_{ST}$ , uma análoga a ela, denominada de  $R_{ST}$  (Slatkin, 1995), desenvolvida especificamente para dados de microssatélites. Parâmetros como o  $R_{ST}$  podem ser calculados como  $R_{ST} = (\bar{S} - S_W) / (\bar{S})$ , em que  $S_W$  e  $\bar{S}$  são, respectivamente, as diferenças de quadrados médios entre tamanhos de alelos entre pares de genes, dentro de populações e entre pares de genes tomados de várias populações, estimados com o auxílio do software  $R_{ST}Cal$  (Goodman, 1997).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

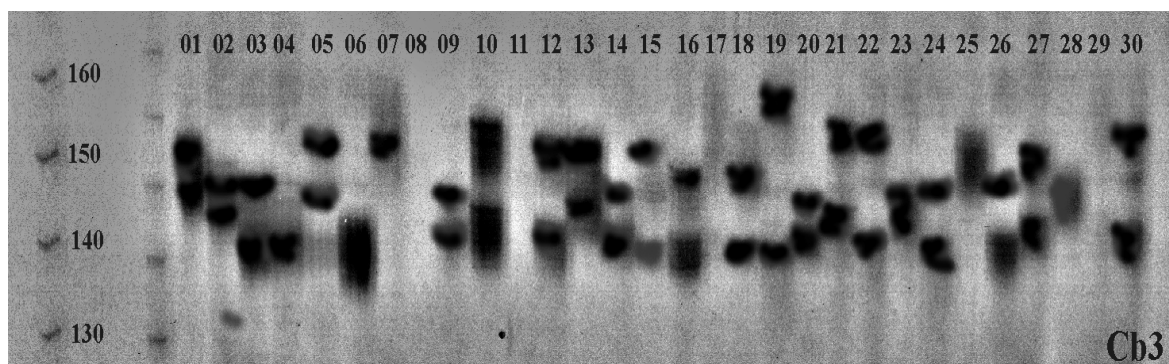
### 4.1 MEDIDAS DE DIVERSIDADE GENÉTICA

#### 4.1.1 Número de alelos por loco

O número de alelos presentes em cada loco e a distribuição desses alelos no conjunto das populações é um indicativo da riqueza alélica presente, e do quanto dessa variabilidade está distribuída entre e dentro das populações. Nas populações de pequizeiro utilizadas para este estudo, a variabilidade de alelos por loco mostrou-se elevada. Os locos com maior número de alelos foram o *Cb13* e o *Cb20*, com 32 e 31 alelos respectivamente e o menor polimorfismo foi observado nos locos *Cb1* e *Cb6*, que apresentaram 22 alelos cada um. A média de alelos por loco foi de 28 alelos. O polimorfismo encontrado nos oito pares de *primers* utilizados neste estudo foi alto e o padrão de bandas para todos os locos estudados foram similares aos padrões contidos nas Figuras 6 e 7.



**Figura 6.** Padrão de polimorfismo apresentado pela população de Alvorada do Norte, utilizando o loco de microsatélite *Cb9* visualizados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%. À esquerda, o marcador de peso molecular, *Ladder* 10 pb



**Figura 7.** Padrão de polimorfismo apresentado pela população de Damianópolis, utilizando o loco de microssatélite *Cb3* visualizados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%. À esquerda, o marcador de peso molecular, *Ladder* 10 pb

O loco de microssatélites com menor quantidade de alelos foi o *Cb5*, com cinco alelos na população de Morrinhos e o loco com maior número de alelos foi o *Cb20* na população de Mambaí, com 20 alelos. O loco mais polimórfico foi *Cb20* com média de 14,45 e o loco menos polimórfico foi o *Cb11* com média de 11,36 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Número de alelos por loco e por população de *C. brasiliense*.

População	Loco de microssatélites								Total
	<i>Cb1</i>	<i>Cb3</i>	<i>Cb5</i>	<i>Cb6</i>	<i>Cb9</i>	<i>Cb11</i>	<i>Cb13</i>	<i>Cb20</i>	
Morrinhos	13	8	5	10	16	13	12	13	90
Hidrolândia	10	16	9	14	0	12	0	11	72
Orizona	19	10	11	10	11	13	16	15	105
Mambaí	13	10	10	16	11	12	14	20	106
Damianópolis	8	9	10	13	13	9	10	15	87
Alvorada	15	11	11	11	10	10	17	14	99
Sta Tereza	12	15	16	10	9	13	13	16	104
Estrela	12	9	18	12	12	7	11	14	95
Mutunópolis	12	11	16	16	14	14	14	18	115
Araguapaz	11	18	10	11	15	8	9	10	92
Iporá	12	16	10	13	15	14	13	13	106
Média alelo/loco	12,45	12,09	11,45	12,36	11,45	11,36	11,72	<b>14,45</b>	97,36

O tamanho dos alelos do loco mais polimórfico (*Cb13*, com 32 alelos) variou de 116 a 184 pb com os alelos consecutivos variando de 2 a 2 pb.

O número de indivíduos genotipados por população e por loco, variou de 15 na população de Mutunópolis (*Cb3*) a 30 indivíduos nas populações de

Damianópolis (*Cb5*), Alvorada e Araguapaz (*Cb9*). A média geral foi de 23,85 indivíduos/loco (Tabela 6).

**Tabela 6.** Número de indivíduos amostrados por população e por loco

População	Número de indivíduos amostrados para todos os locos de microssatélites								Nº médio de indivíduos amostrados/população
	<i>Cb1</i>	<i>Cb3</i>	<i>Cb5</i>	<i>Cb6</i>	<i>Cb9</i>	<i>Cb11</i>	<i>Cb13</i>	<i>Cb20</i>	
Morrinhos	25	21	22	23	28	23	21	27	23,75
Hidrolândia	29	29	26	26	0	27	0	26	20,38
Orizona	29	23	22	23	29	25	24	27	25,25
Mambaí	28	29	29	26	28	28	28	23	27,38
Damianópolis	28	28	<b>30</b>	24	29	27	29	28	27,88
Alvorada	29	29	28	28	<b>30</b>	29	29	29	28,88
Sta Tereza	24	20	25	21	22	17	20	24	21,63
Estrela	19	21	25	29	16	16	22	25	21,63
Mutunópolis	23	<b>15</b>	25	27	15	17	23	24	21,13
Araguapaz	26	16	18	23	<b>30</b>	24	23	27	23,38
Iporá	19	22	18	16	25	21	28	20	21,13
Nº médio de indivíduos/loco	25,36	23,00	24,36	24,18	22,91	23,09	22,45	25,45	23,85

#### 4.1.2 Heterozigosidades

A heterozigosidade média observada ( $\hat{H}_o$ ), no conjunto de onze populações de pequiizeiro foi de 0,63207 variando de 0,54574 a 0,75814 nas populações de Araguapaz e Iporá respectivamente (Tabela 7). A heterozigosidade média esperada ( $\hat{H}_e$ ) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, em todas as populações, foi bem superior a observada, variando em torno da média de 0,88396. Foi observado na população de Hidrolândia o menor valor de  $\hat{H}_e$  (0,84262) enquanto a população de Mutunópolis apresentou o maior valor (0,91981). Em todas as populações  $\hat{H}_e$  foi maior que  $\hat{H}_o$  indicando excesso de homozigose e carência de heterozigotos em todas as populações.

O tamanho efetivo populacional foi estimado de acordo com Vencovsky (1997) para assegurar que o tamanho das amostras utilizadas para este estudo foram suficientes para as inferências estatísticas (Tabela 7). A média de indivíduos amostrados para todos os locos foi maior que o tamanho efetivo estimado.

### 4.1.3 Coeficiente de fixação $\hat{f}$

A Tabela 7 mostra o índice de fixação  $\hat{f}$  ( $\hat{F}_{IS}$ ) estimado para cada população a partir dos índices de heterozigosidades ( $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$ ). Na média das populações, o valor de  $\hat{f}$  foi alto e significativo:  $\hat{f} = 0,28938$ . O mesmo ocorrendo quando observamos os valores de  $\hat{f}$  para as populações individuais, que variaram de 0,17091 (Iporá) à 0,3898 (Araguapaz). Através da estimativa da taxa de cruzamento aparente ( $\hat{t}_a$ ) na geração atual e com os oito locos de microssatélites analisados, foi possível verificar que, na média, está ocorrendo uma taxa de autofecundação muito elevada (44,2%) e somente ocorre cruzamentos entre plantas diferentes em 55,8% dos casos.

**Tabela 7.** Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade genética em onze populações de *C. brasiliense*.

População	$n$	$L$	$nA$	$A$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{f}$	$\hat{N}_e$	$\hat{t}_a$
Morrinhos	23,7	8	11,25	90	0,65828	0,86246	0,24073	19,1	0,63889
Hidrolândia	20,4	6	12,00	72	0,57953	0,84262	0,31639	15,5	0,51930
Orizona	25,2	8	13,12	105	0,57945	0,89095	0,35422	18,6	0,47686
Mambaí	27,4	8	13,25	106	0,73414	0,89977	0,18687	23,1	0,68508
Damianópolis	27,9	8	10,87	87	0,66450	0,87171	0,24084	22,5	0,61181
Alvorada	28,9	8	12,38	99	0,61022	0,87771	0,30854	22,1	0,52842
Sta Tereza	21,6	8	13,00	104	0,59903	0,88852	0,33109	16,2	0,50258
Estrela	21,6	8	11,87	95	0,56144	0,86989	0,36016	15,9	0,47041
Mutunópolis	21,1	8	14,37	115	0,66229	0,91981	0,28565	16,4	0,55563
Araguapaz	23,4	8	11,50	92	0,54574	0,88400	0,38780	16,8	0,44112
Iporá	21,1	8	13,25	106	0,75814	0,91065	0,17091	18,0	0,70807
Média	23,8	7,81	12,44	97,36	0,63207	0,88396	0,28938	18,6	0,55801

$n$ : número médio de indivíduos amostrados por loco;  $L$  número de locos microssatélites;  $nA$ : número médio de alelos;  $A$ : número total de alelos;  $\hat{H}_o$ : heterozigosidade observada;  $\hat{H}_e$ : heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $\hat{f}$ : índice de fixação,  $\hat{N}_e$ : tamanho efetivo populacional;  $\hat{t}_a$ : taxa de cruzamento aparente

### 4.1.4 Teste de EHW

A análise das frequências alélicas para a condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações, através do teste exato de Fisher, mostrou que apenas duas

populações, Mutunópolis e Iporá, não acusaram significância no teste para os oito locos utilizados (Tabela 8). As demais populações tiveram um número variado de locos apresentando desvios do EHW, pela ausência de heterozigotos, sendo a população de Araguapaz, a população que apresentou maior percentagem de locos com desvios: 75%.

Nas populações de Morrinhos e Mambaí apenas um dos oito locos avaliados não se encontram em equilíbrio. A população que apresentou maior número de locos em desvios do que era esperado sob equilíbrio foi Araguapaz com apenas 25% dos locos em equilíbrio. Enquanto que as populações de Morrinhos e Mambaí apresentam 87,5% e a população de Damianópolis 75% dos locos em equilíbrio.

**Tabela 8.** Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando 8 locos de microssatélites. (Os dados em negrito são referentes aos locos que não se encontram em EHW)

Populações	Cb1	Cb3	Cb5	Cb6	Cb9	Cb11	Cb13	Cb20	(%) Loco EHW
Morrinhos	0,586	<b>0,001</b>	0,364	0,519	0,533	1,000	1,000	0,081	87,5
Hidrolândia	<b>0,000</b>	1,000	0,683	1,000	-	0,309	-	<b>0,000</b>	66,6
Orizona	1,000	<b>0,015</b>	<b>0,017</b>	0,162	0,165	<b>0,004</b>	1,000	<b>0,022</b>	50,0
Mambaí	0,064	0,055	0,337	0,288	1,000	1,000	1,000	<b>0,008</b>	87,5
Damianópolis	0,122	1,000	1,000	<b>0,001</b>	0,165	<b>0,000</b>	0,298	0,533	75,0
Alvorada	0,336	1,000	<b>0,030</b>	<b>0,016</b>	<b>0,000</b>	<b>0,006</b>	0,106	0,563	50,0
Sta Tereza	<b>0,002</b>	0,214	0,287	<b>0,049</b>	1,000	0,096	<b>0,001</b>	0,063	62,5
Estrela	0,489	0,195	1,000	<b>0,003</b>	0,591	<b>0,004</b>	0,373	<b>0,027</b>	62,5
Mutunópolis	1,000	0,461	1,000	0,121	1,000	0,096	0,299	0,152	100,0
Araguapaz	<b>0,021</b>	1,000	<b>0,033</b>	0,128	<b>0,016</b>	<b>0,013</b>	<b>0,035</b>	<b>0,000</b>	25,0
Iporá	0,489	0,224	0,512	1,000	0,558	0,540	1,000	1,000	100,0

#### 4.1.5 Alelos exclusivos

A frequência de alelos exclusivos verificados neste estudo foi relativamente alta para algumas populações quando avaliados no conjunto de todos os alelos privados encontrados nas populações. Neste contexto, a maior frequência de alelos exclusivos foi observada na população de Morrinhos, com 18% do total, seguida das populações de Araguapaz e Iporá, com 15% do total de alelos exclusivos (Tabela 9). Entretanto, quando avaliamos os alelos exclusivos no conjunto de todos os alelos obtidos para os oito locos microssatélites utilizados, a baixa frequência destes alelos (de 0,02 a 0,08) mostra que estes alelos não contribuíram significativamente

para o cálculo das estimativas dos parâmetros populacionais. As únicas populações que não apresentaram alelos exclusivos foram as populações de Estrela do Norte e Damianópolis.

**Tabela 9.** Frequência absoluta e relativa de alelos privados no conjunto de onze populações de *Caryocar brasiliense*

População	Frequência de alelos privados em relação ao número de alelos privados encontrados em todas as populações		Frequência de alelos privados em relação ao número total de alelos na população	
	Nº alelos privados	Frequência relativa de alelo privado por população	Frequência de alelos por população	Frequência Relativa de alelos privados por população
Morrinhos	7	0,18	90	0,08
Hidrolândia	4	0,10	72	0,06
Orizona	4	0,10	105	0,04
Mambaí	4	0,10	106	0,04
Damianópolis	0	0,00	87	0,00
Alvorada	2	0,05	99	0,02
Santa Tereza	3	0,08	104	0,03
Estrela	0	0,00	95	0,00
Mutunópolis	4	0,10	115	0,03
Araguapaz	6	0,15	92	0,07
Iporá	6	0,15	106	0,06
Total	40	1	1071	0,41

## 4.2 ESTRUTURA GENÉTICA

### 4.2.1 $\hat{F}_{ST}$ e $\hat{R}_{ST}$

O valor médio do  $\hat{F}_{ST}$  mostra que a maior parte da variabilidade genética está concentrada dentro das populações, mas precisamente, verificou-se que 6,44% da variabilidade genética está entre populações e 93,6% dentro das populações indicando pouca diferenciação entre as populações amostradas (Tabela 10). O cálculo do  $\hat{R}_{ST}$  manteve a tendência da maior parte da variabilidade estar dentro das populações. Entretanto, o valor de  $\hat{R}_{ST}$  (0,4392) considerando o tamanho em pares de bases dos oito locos microssatélites, é uma estimativa muito maior quando comparada ao  $\hat{F}_{ST}$ , sugerindo grande diferenciação genética entre as populações de *C. brasiliense* estudadas.

**Tabela 10.** Estimativa das estatísticas  $\hat{F}$  de Wright, de  $\hat{R}_{ST}$  e do número de migrantes por geração ( $\hat{N}_m$ ) baseado no  $\hat{F}_{ST}$  em 11 populações naturais de *C. brasiliense*. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade

Loco	$\hat{f} = \hat{F}_{IS}$	$\hat{F} = \hat{F}_{IT}$	$\hat{\theta}_p = \hat{F}_{ST}$	$\hat{R}_{ST}$	$\hat{N}_m$
Cb1	0,352	0,304	0,069	0,435	3,373
Cb3	0,347	0,307	0,057	0,330	4,136
Cb5	0,292	0,229	0,081	0,595	2,836
Cb6	0,343	0,303	0,057	0,272	4,136
Cb9	0,251	0,208	0,054	0,559	4,138
Cb11	0,431	0,392	0,064	0,408	3,656
Cb13	0,300	0,243	0,075	0,606	3,083
Cb20	0,328	0,298	0,043	0,295	5,564

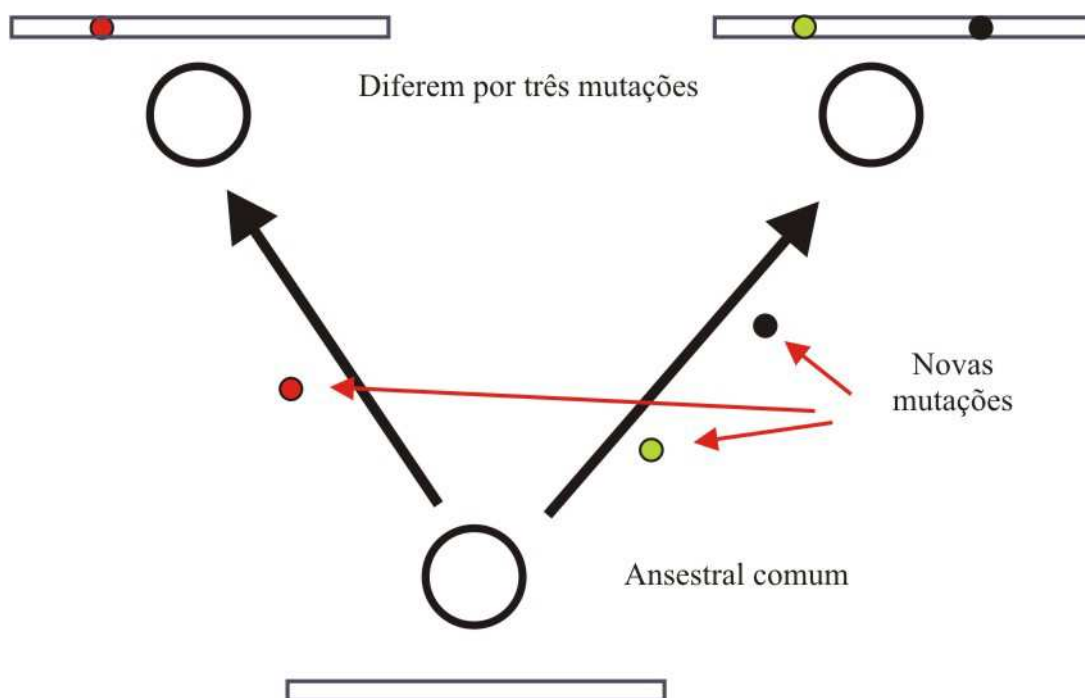
  

Estimativas de IC de 95%					
	$\hat{f} = F_{IS}$	$\hat{F} = F_{IT}$	$\hat{\theta}_p = \hat{F}_{ST}$	$\hat{R}_{ST}$	$\hat{N}_m$
Média	0,2959	0,3414	0,0644	0,4392	3,8955
Lim. superior	0,3242	0,3651	0,0705	0,4375	3,3214
Lim. Inferior	0,2493	0,2973	0,0546	0,4662	4,3313

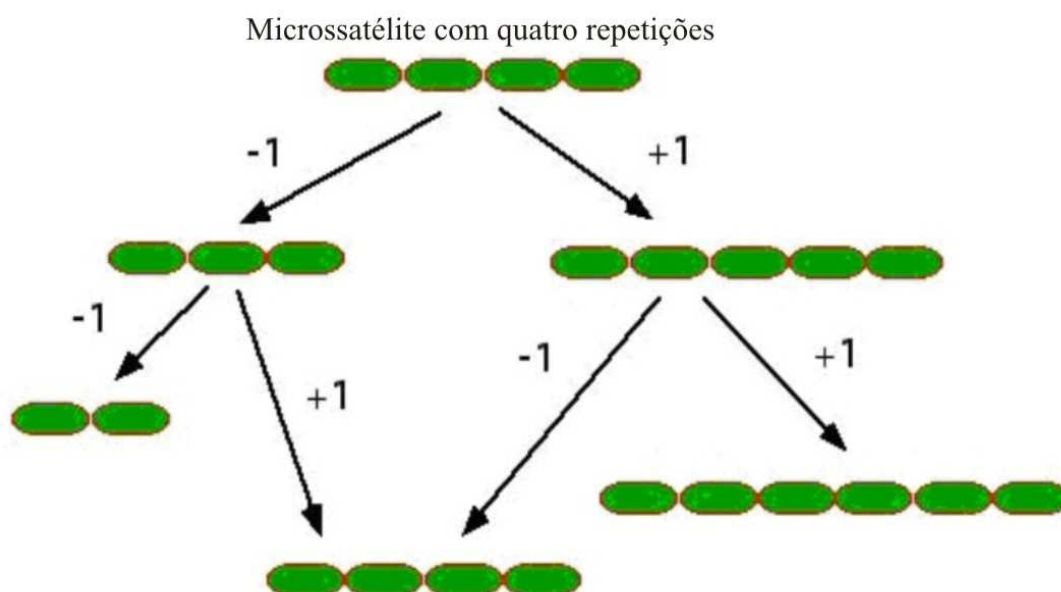
As diferenças encontradas entre as estimativas de  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  podem estar associadas aos diferentes modelos de mutações definidas em cada uma destas estimativas.  $F_{ST}$  é obtido com base no modelo de alelos infinitos (Figura 8), em que cada mutação gera um alelo diferente e os alelos iguais são gerados por descendência. Enquanto que  $R_{ST}$  é obtido com base no modelo de mutações aos passos (*stepwise*) (Figura 9), onde os alelos iguais podem ser gerados por homoplasia. Conseqüentemente, esses alelos são idênticos por estado e não por descendência.

#### 4.2.2 $\hat{N}_m$

O número de migrantes por geração ( $\hat{N}_m$ ), calculado a partir da estimativa da  $F_{ST}$  foi de 3,8955 indivíduos por geração, indicando uma taxa de migrantes entre as populações suficiente para a coesão entre as subpopulações (Tabela 10). Porém, esta taxa de migração pode estar superestimada. As análises foram realizadas em indivíduos adultos, representantes de populações que só num passado muito recente, aproximadamente 50 anos, sofreram efeitos da antropização. A diminuição do fluxo gênico devido à fragmentação do habitat talvez seja verificada somente em gerações subseqüentes.



**Figura 8.** Modelo de Alelos Infinitos – (Kimura & Crow, 1964)



**Figura 9.** Modelo de *stepwise* (Kimura & Ohta, 1978)

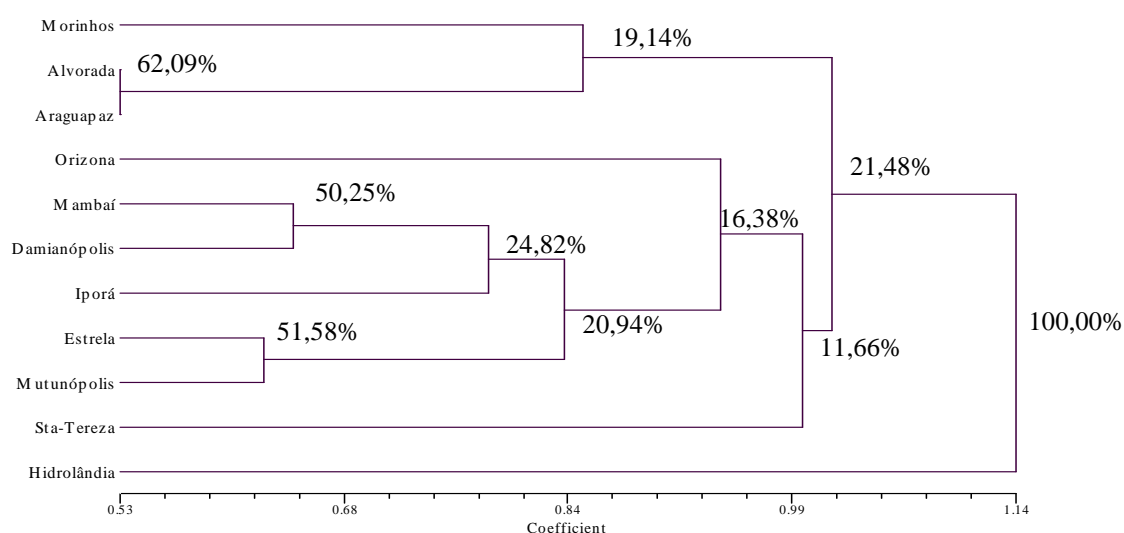
#### 4.3 CORRELAÇÕES ENTRE DISTÂNCIAS

As distâncias genéticas de Nei calculadas entre as populações variaram de 0,5273 a 1,5436 como pode ser observado na Tabela 11, bem como a representação em

dendrograma, da distância e da divergência genética na Figura 10. Os agrupamentos formados pelo dendrograma apresentam baixa consistência nos nós e apenas o isolamento da população de Hidrolândia (100%) e o grupo formado por Alvorada e Araguapaz (62,09%) obtiveram uma maior consistência. As populações de Santa Tereza de Goiás e Hidrolândia são as populações mais divergentes do conjunto de onze populações de *C. brasiliense* utilizadas para este estudo, com distâncias de 1,02 e 1,14 respectivamente.

**Tabela 11.** Distâncias genéticas obtidas pela distância de Nei (1972) entre pares de populações

Pop	Mor	Hid	Ori	Mam	Dam	Alv	STe	Est	Mut	Ara	Ipo
Mor	0,0000										
Hid	<b>1,5436</b>	0,0000									
Ori	0,9398	1,3265	0,0000								
Mam	1,3632	1,1088	0,9163	0,0000							
Dam	1,4093	1,1566	1,0136	0,6462	0,0000						
Alv	0,7765	0,9326	1,0623	0,9770	0,8329	0,0000					
STe	1,4052	1,1449	1,0139	1,0028	0,8454	0,7936	0,0000				
Est	1,0432	1,0500	0,9125	0,7455	1,0069	0,9526	1,2913	0,0000			
Mut	0,9816	0,9326	0,8774	0,7635	0,7366	0,7044	0,7957	0,6257	0,0000		
Ara	0,9133	0,9379	1,2745	0,9255	1,0009	<b>0,5273</b>	0,9513	1,0057	0,7933	0,0000	
Ipo	1,1940	1,2979	0,9814	0,6954	0,8652	1,0100	1,0275	0,8750	0,8667	0,7408	0,0000

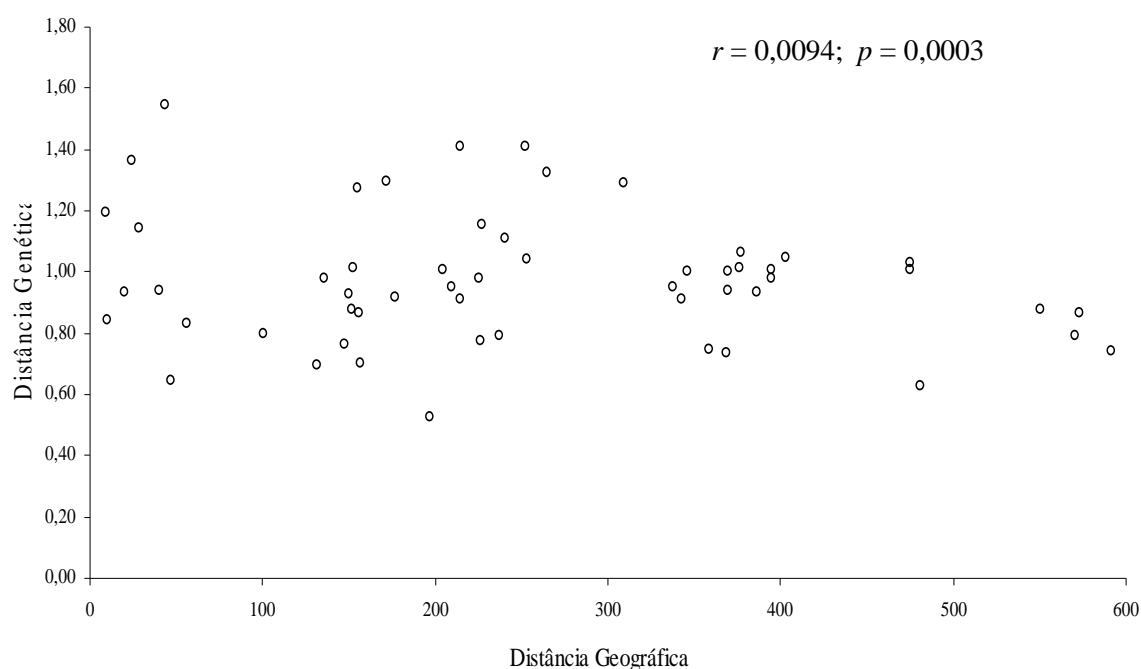


**Figura 10.** Padrão de identidade genética entre 11 populações de pequizeiro, definido pelo agrupamento UPGMA, obtida a partir das distâncias genéticas de Nei (1972)

A correlação entre as matrizes de distâncias genéticas (Tabela 11) e geográficas (Tabela 12) foi positiva e significativa, porém, muito baixa ( $r = 0,0094$ ;  $p = 0,0003$ ) (Figura 11), sugerindo que não existe um padrão espacial para a variabilidade genética existente entre as populações.

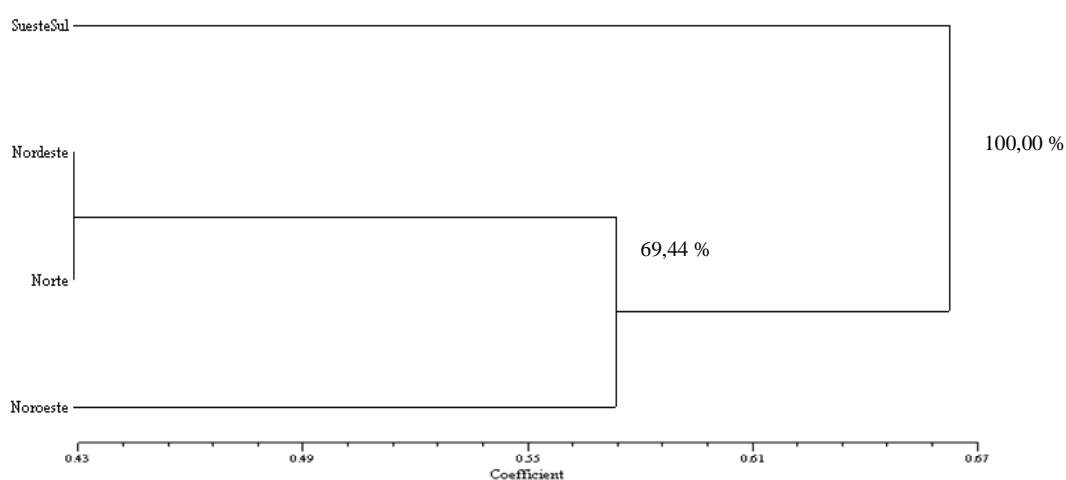
**Tabela 12.** Distâncias geográfica entre pares de populações, obtidas pelas coordenadas geográficas de onze populações de *C. brasiliense* no Estado de Goiás

Pop	Mor	Hid	Ori	Mam	Dam	Alv	STe	Est	Mut	Ara	Ipo
Mor	0,00	43,92	40,57	252,59	253,37	264,50	403,38	377,40	394,92	394,92	308,94
Hid		0,00	24,19	226,44	225,82	240,70	386,58	376,14	369,56	368,44	100,18
Ori			0,00	214,36	214,63	227,27	369,94	343,09	358,50	346,03	338,04
Mam				0,00	9,18	20,27	171,94	152,03	147,27	155,62	475,34
Dam					0,00	28,08	177,13	155,11	149,89	236,76	481,27
Alv						0,00	152,90	135,72	131,69	209,52	475,11
STe							0,00	47,27	56,37	156,55	550,63
Est								0,00	10,12	197,30	571,04
Mut									0,00	204,37	573,17
Ara										0,00	591,55
Ipo											0,00



**Figura 11.** Representação da correlação ( $r$ ) entre a matriz de distâncias geográficas e matriz de distâncias genéticas, obtidas de 8 locos de microssatélites em 11 populações de *C. brasiliense* no Estado de Goiás em 2005. Significância de  $r$  dada pela probabilidade.

Apesar do dendrograma (Figura 10) ter apresentado nós com baixa consistência, quando avaliamos as populações agrupadas por regiões, observamos que a consistência dos nós obtidos foram elevadas, as regiões mais próximas geneticamente são as regiões Norte e Noroeste (distância de 0,43) e a região mais distante (0,72) é a região Sudeste/Sul (Figura 12 e Tabela 13), onde está localizada a população de Hidrolândia que, no dendrograma anterior, é a mais divergente do conjunto.



**Figura 12.** Padrão de identidade genética entre as 4 regiões do Estado de Goiás, onde foram obtidas as populações de pequi, definido pelo agrupamento UPGMA, obtida a partir das distâncias genéticas de Nei (1972)

**Tabela 13.** Distâncias genéticas obtidas pela distância de Nei (1972) entre pares de regiões

	Sudeste/Sul	Nordeste	Norte	Noroeste
Sudeste/Sul	0,00000			
Nordeste	0,68369	0,00000		
Norte	0,60015	<b>0,43455</b>	0,00000	
Noroeste	<b>0,72585</b>	0,55652	0,60384	0,00000

Os oito locos microssatélites empregados neste estudo detectaram altos níveis de variação genética confirmando o alto conteúdo de informação genética que este tipo de marcador pode proporcionar para os estudos de parâmetros genéticos populacionais de *C.*

*brasiliense* (Collevatti et al., 1999).

Os valores para as heterozigosidades médias esperada ( $\hat{H}_e = 0,884$ ) e observada ( $\hat{H}_o = 0,632$ ) indicaram alto nível de diversidade gênica nas populações. Estes valores foram similares aos  $\hat{H}_e = 0,856$  e  $\hat{H}_o$  de 0,765 encontrados por Collevatti et al., (2001) que utilizaram 10 locos microssatélites em dez populações naturais de *C. brasiliense*. Porém, quando comparados com estudos de estrutura genética de populações naturais de pequizeiro desenvolvidos com isoenzimas, os valores de  $\hat{H}_e$  e  $\hat{H}_o$  foram superiores. Oliveira (1998), utilizando quatro locos isoenzimáticos e indivíduos de 11 locais diferentes obteve uma variação de 0,317 a 0,413 e 0,186 a 0,310 para  $\hat{H}_e$  e  $\hat{H}_o$ , respectivamente. Melo Júnior et al., (2004) trabalhando com quatro populações e dez locos isoenzimáticos encontrou uma variação entre 0,450 a 0,530 para  $\hat{H}_e$  e 0,583 a 0,817 para  $\hat{H}_o$ . Esta diferença sendo devida, principalmente, ao maior número de alelos obtidos pelos marcadores microssatélites em relação às isoenzimas.

Porém, a hipervariabilidade dos locos microssatélites pode ter sido uma das causas para que alguns locos apresentassem desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg durante a realização do teste exato de Fisher. O número de indivíduos genotipados por população (aproximadamente trinta indivíduos) seria relativamente limitado para amostrar todas as possibilidades de genótipos que poderiam ser formados a partir dos vários alelos possíveis para cada loco marcador (Weir, 1996). Outro fator poderia estar relacionado com a ausência de heterozigotos detectada pelas estimativas dos índices de fixação.

As estimativas dos índices de fixação ( $\hat{f}$ ) nas populações foram altas indicando que os alelos dentro das populações analisadas não estão unidos randomicamente. Porém, a análise de valores de  $\hat{f}$  encontrados em outros trabalhos realizados com a espécie, mostra que tais valores são contrastantes. Oliveira (1998), trabalhando com progênies e isoenzimas, encontrou valores positivos de  $\hat{f}$ , variando de 0,21 a 0,50 com um  $\hat{f}$  médio de 0,33, indicando alta endogamia. Entretanto, Melo Júnior et al., (2004) encontraram valores de  $\hat{f}$  variando de -0,548 a -0,299 nas quatro populações estudadas com isoenzimas. Estes resultados negativos indicam provável ausência de endogamia e excesso de heterozigotos nestas populações, além de sugerir a existência de mecanismos seletivos atuando em favor dos heterozigotos. Collevatti et al., (2001)

trabalhando com populações naturais de pequiizeiros e locos microssatélites encontraram um  $\hat{f}$  médio elevado de 0,11. Porém, os autores discutem que devido a hipervariabilidade dos locos microssatélites utilizados no trabalho, os resultados podem estar sendo influenciados pelo efeito da amostragem dos indivíduos e pela natureza mutacional dos marcadores microssatélites. O tamanho das amostras pode ser limitado para amostrar eficientemente todas as possibilidades de genótipos em cada loco e o valor de  $\hat{f}$  ser superestimado.

Porém, mesmo que o tipo de marcador utilizado possa influenciar no valor da taxa de endogamia média das populações, o sistema de cruzamento de *C. brasiliense* também é uma variável importante. Visto que a espécie é considerada como completamente alógama (Collevatti, et al., 2001) com flores hermafroditas, sem autoincompatibilidade, polinizadas principalmente por pequenos morcegos (Gribel 1986).

Segundo Oliveira (1998), a elevada taxa de endogamia encontrada poderia ser o resultado do movimento restrito do pólen, elevando as chances de cruzamentos entre parentes e a fecundação entre flores vizinhas, dentro da mesma planta. Outros fatores que também poderiam estar contribuindo para incrementar a taxa de endogamia seriam o longo ciclo de vida da espécie e a dormência das sementes, que favorecem a sobreposição de gerações. Esses fatos elevam consideravelmente a possibilidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados. Conseqüentemente, esses fatores aumentariam o tempo efetivo de cada geração aumentando as possibilidades de cruzamentos endogâmicos.

Os parâmetros de diferenciação genética entre populações de *C. brasiliense* estimados nesse estudo indicaram uma significativa diferenciação entre as populações tanto pela frequência dos alelos ( $\hat{F}_{ST} = 0,064$ ) quanto pelo seu tamanho ( $\hat{R}_{ST} = 0,439$ ). Collevatti et al., (2001), utilizando marcadores microssatélites em 10 populações de *C. brasiliense* de vários Estados brasileiros, encontrou valores de 0,07 ( $\hat{\theta}$ ) e 0,29 ( $\hat{R}_{ST}$ ) entre populações. Oliveira (1998), analisando populações de *C. brasiliense* da Região Sudeste do Estado de Goiás com quatro locos isoenzimáticos, obteve um  $G_{ST}$  de 0,022. Para as quatro populações analisadas por Melo Júnior et al., (2004) com dez locos isoenzimáticos, os autores encontraram um valor de  $\hat{\theta} = 0,02$ .

Todas estas estimativas indicam que os alelos não estão randomicamente distribuídos entre e dentro das populações, uma vez que as estimativas foram significativas e diferentes de zero. Entretanto, estes valores mostram que a maior parte da variabilidade

genética ainda encontra-se dentro das populações, porém há uma quantidade significativa de variabilidade genética entre as populações. Tal variação entre populações indica um aumento da homozigose pela subdivisão, com uma conseqüente redução da heterozigose e da variabilidade genética, de uma maneira independente da alogamia da espécie.

Porém, o que mais chama a atenção nos resultados do presente estudo é que o valor de  $\hat{R}_{ST}$  indica um nível de diferenciação muito maior do que o  $\hat{F}_{ST}$ . Esta divergência entre as estimativas de parâmetros genéticos baseadas na identidade por estado ( $\hat{R}_{ST}$ ) e na identidade pela descendência ( $\hat{F}_{ST}$ ) já havia sido indicada por Collevatti et al., (2001) em seu trabalho com marcadores microssatélites e populações naturais de *C. brasiliense*. Segundo os autores, como os marcadores microssatélites são altamente variáveis e sujeitos a altas taxas de mutação, eles usualmente mostram altos níveis de heterozigosidade dentro das populações. Portanto, estatísticas baseadas no modelo de alelos infinitos (*infinite allele model*), proposto por Kimura & Crow (1964) que consideram alelos sendo idênticos por descendência, como  $\hat{\theta}$  ou  $\hat{F}_{ST}$ , tendem a subestimar a diferenciação entre populações (Slatkin, 1995; Hedrick, 1999), assim, é de se esperar altos valores de  $R_{ST}$  quando comparados com  $\hat{\theta}$  ou  $\hat{F}_{ST}$ .

$\hat{R}_{ST}$  pode ser interpretado como a correlação entre o tamanho do alelo de indivíduos diferentes na mesma população. Embora análogo ao  $\hat{\theta}$  e ao  $\hat{F}_{ST}$ , para o cálculo do  $R_{ST}$  assumiu-se que marcadores microssatélites seguem um modelo de mutação onde cada alelo surge pela perda ou ganho de uma unidade de repetição por vez (*stepwise mutation model*) (Kimura & Ohta, 1978). Assim, alelos de microssatélites seriam mais prováveis de serem idênticos por estado do que por descendência e a diferenciação genética das populações deveria ser melhor acessada pelo  $\hat{R}_{ST}$  (Slatkin, 1995).

Entretanto, esta divergência entre modelos para o cálculo de parâmetros genéticos nem sempre ocorre. Zucchi et al., (2003), pesquisando a estrutura genética de populações de cagaiteiras (*Eugenia dysenterica*) com sete locos microssatélites, obtiveram valores similares de  $\hat{F}_{ST}$  e  $\hat{R}_{ST}$ : 0,250 e 0,269 respectivamente. O mesmo número de marcadores foi utilizado por Novick et al., (2003) para avaliar a diferenciação genética de populações de mogno (*Swietenia macrophylla*) e obter valores de 0,109 para  $\hat{F}_{ST}$  e 0,177 para  $\hat{R}_{ST}$ . Segara-Moragues et al., (2005) utilizaram 14 locos microssatélites para analisar

populações de *Bordera chouardii* (Dioscoreaceae) e encontraram valores de  $\hat{F}_{ST} = 0,35$  e  $\hat{R}_{ST} = 0,32$ .

Da mesma forma que Collevatti et al., (2001), também foi conduzida uma análise mais conservadora dos parâmetros genéticos na qual os alelos com baixas frequências foram consolidados com os alelos mais próximos e analisados com o alelo mais frequente. Entretanto, nos dois estudos, as correlações entre tamanho de alelos e frequência de alelos não mudaram quando esta análise mais conservadora foi feita.

Entretanto, em análises complementares agrupando-se as populações em regiões verificou-se a presença de nós mais consistentes e agrupamento com um arranjo um pouco diferenciado do padrão obtido quando foram avaliadas as populações isoladamente. Embora os valores obtidos para  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  tenham sido menores, ainda assim, foi possível verificar os mesmos padrões de diferenciação genética mencionadas anteriormente.

A baixa consistência dos nós no dendrograma das distâncias genéticas entre as populações, não permitiu a formação de grupos distintos e o padrão espacial, indicado pela correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, obtidas com as onze populações analisadas nesse estudo, não mostrou o modelo evolutivo de isolamento por distância observado nas populações de *C. brasiliense* estudadas por Collevatti et al., (2001) ou em populações de *E. dysenterica*, outra espécie do Cerrado, analisadas por Zucchi et al., (2003) ou por Telles (2000) trabalhando com isoenzimas em populações da mesma espécie. O gráfico de correlação genética e geográfica não evidenciou relação positiva entre estas duas distâncias ( $r = 0,0094$ ;  $p = 0,0003$ ), refletindo um modelo de diferenciação aleatório.

Finalmente, os resultados do presente estudo indicam que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das onze populações analisadas, embora uma quantidade razoável de variação entre populações também ocorra. Pela análise dos dados, estas populações não são muito divergentes entre si, além de possuírem um valor alto para a estimativa do número médio de migrantes por geração ( $\hat{N}_m = 3,89$ ). Este número indica um fluxo gênico suficientemente capaz de impedir a ocorrência dos efeitos de deriva genética nas populações estudadas. Entretanto, como a maioria dos indivíduos amostrados eram adultos, e como a espécie possui um ciclo de vida longo, a taxa de migrantes reflete eventos ocorridos no passado. Provavelmente, a intensidade deste fluxo gênico é menor hoje e diminuirá ainda mais no futuro caso a intensa exploração extrativista, a qual

algumas destas populações estão sujeitas, ou a fragmentação de seu habitat pela formação de pastagens, plantio de monoculturas ou outra ação antrópica, não sejam controladas

## 5 CONCLUSÕES

As informações genéticas obtidas com os oito locos microssatélites indicaram que, até o momento, as onze populações analisadas possuem altos níveis de diversidade genética. Esta diversidade genética está concentrada, principalmente, dentro das populações com uma baixa estruturação entre elas e não está estruturada no espaço.

Embora haja uma quantidade razoável de variação entre populações, elas não se mostraram muito divergentes, fato que pode estar sendo amenizado pelo elevado número de migrantes por geração ( $\hat{N}_m = 3,89$ ). Esse número é suficientemente capaz de impedir os efeitos da deriva genética das populações estudadas. Esse número de migrantes está refletindo um evento do passado visto que, a espécie é perene e possivelmente esteja inserida nesse ambiente a cerca de 60 anos, o que não implica que as populações mais jovens não estejam sofrendo os efeitos da deriva genética. Sendo necessário estudos com indivíduos jovens, ou com progênies para que se possa avaliar os efeitos da endogamia em gerações futuras.

O modelo de fluxo gênico apresentado está mais compatível com o modelo de ilhas, do que com o modelo de isolamento por distância e a estimativa da taxa de fecundação cruzada aparente ( $t_a = 0,55801$ ) sugere que a população em estudo possui sistema reprodutivo misto. Na visualização em dendrograma não foi possível verificar a formação de grupos distintos. As populações mais próximas são Araguapaz e Alvorada do Norte e a mais divergente do conjunto de onze populações é Hidrolândia.

Na visualização em dendrograma dos agrupamentos das quatro regiões em estudo, também não houve a formação de grupos distintos, embora tenha se notado que as regiões mais próximas são as regiões Norte (Mutunópolis, Estrela do Norte e Santa Tereza) e Nordeste (Mambaí, Damianópolis e Alvorada ) e a região mais divergente é a Sudeste/Sul onde estão situadas as populações de Morrinhos, Hidrolândia e Orizona.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M.S.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. Madison: **Crop Science**, v. 35, n. 5, p. 1439-1445, 1995.

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

ANJOS, J.R.N.; CHARCHAR, M.J.A.; AKIMOTO, A.K. Ocorrência de antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequi no Distrito Federal, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 96-98, jan.-fev. 2002.

ARAÚJO, T.C.C. **Estudo da variabilidade genética e estrutura populacional de *Caryocar brasiliense* Camb. no Estado de Goiás utilizando marcadores RAPD**. 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.

AVIDOS, M.F.; FERREIRA, L.T. Frutos dos cerrados: preservação gera muitos frutos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 3, n. 15, p. 36-41, jul.-ago. 2000.

BARRADAS, M.M. Informações sobre floração, frutificação e dispersão do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb. - Caryocaraceae). **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 24, n. 11, p. 1063-1068, nov. 1972.

BARTON, N.H. SLATKIN, M. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. **Heredity**, London, v. 56, n. 3, p. 409-415, jun. 1986.

BECKMANN, J.S. Genomic genetics and plant genetic improvement. In: SCHOOK, L.B.; LEWIN, H.A.; MCLAREN, D.G. (Ed.). **Gene-mapping techniques and applications**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap. 10, p. 201-229.

BECKMANN, J.S.; WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, v. 12, n. 4, p. 627-631, abr. 1992.

BELL, C.J.; ECKER, J.R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. **Genomics**, v. 19, n. 1, p. 137-144, 1994.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BRAGA, R. Pequi, recurso alimentar do sertão. **Jangada Brasil**, ano IV, n. 44 abr. 2002.

BURT, D.W.; BUMSTEAD, N.; BITGOOD, J.J.; DE LEON, F.A.P.; CRITTENDEN, L.B. Chicken genome mapping: a new era in avian genetics. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 5, p. 190-194, 1995.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v. 23, n. 1, p. 72-84, mar. 1969.

COELHO, A.S.G. **Software BOOD**, versão 3.03: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de *bootstrap*. Laboratório de Genética Vegetal, DBG/ICB/UFG, 2000.

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, n. 6, p. 748-756, 1999.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, London, v. 10, n. 2, p. 349-356, 2001.

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA-sequence of 2-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, n. 1, p. 66-71, 1991.

COUTO, M.A.; CHAVES, L.J.; DUARTE, J.B.; NAVES, R.V. Variabilidade genética de caracteres juvenis em sub-populações e progênies de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...** Viçosa: Associação Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2001. 1 CD-ROM.

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAIA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, 1999.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, n. 10, p. 1585-1592, out. 1999.

DINIZ, I.R.; MORAIS, H.C. Local pattern of host plant utilization by lepidopteran larvae in the cerrado vegetation. **Entomotropica**, v. 17, n. 2, p. 115-119, ago. 2002.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetic-mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, n. 4, p. 746-756, out. 1991.

EISSEN, J.A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: University Press, 1999. cap. 4, p. 35-50.

ESTOUP, A.; PRESA, P.; KRIEG, F.; VAIMAN, D.; GUYOMARD, R. (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellites - a new class of genetic-markers for salmo-trutta L. (brown trout). **Heredity**, v. 71, n. 5, p. 488-496, nov. 1993.

FACIOLI, N.L.; GONÇALVES, L.A.G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 1998.

FALCONER, D.D. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1996. 220 p.

FORÉ, S.A.; HICKEY, R.J.; VANKAT, J.L.; GUTTMAN, I.S.; SHAEFER, R.L. Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. **Canadian Journal of Botany**, v.70, n. 8, p.1659-1968, 1992.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**, 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631 p.

GOODMAN, S.J. RST Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 9, p. 881-885, set. 1997.

GRIBEL, R. **Ecologia da polinização e da dispersão de *Caryocar brasiliense* Camb. (*Caryocaraceae*) na região do Distrito Federal**. 2001. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia)-Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1986.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. 856 p.

GUIMARÃES JUNIOR, P.R.; GALETTI, M. Frutos dispersos por mamíferos extintos **Ciência Hoje**, vol. 29, n. 173, p. 83-85, jul. 2001.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T.; SEIDMAN, M.; STOLLAR, B.D. Characterization of genomic poly (dT-dG) and poly (dC-dA) sequence: structure organization, and conformation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, n. 12, p. 2610-2621, 1984.

HARIDASAN, M. Agroforestry systems for the Cerrado region of Central Brazil: potential and constraints. In: Reifsnnyder, W.E.; Darnhofer, T.O. (Ed.). **Meteorology and agroforestry**. International workshop on the applications of meteorology to

agroforestry systems, Planning and Management. Nairobi (Kenya), fev. 1987. Nairobi: ICRAF, 1989. p. 257-272.

HAY, J.D.; BIZERRIL, M.X.A. CALOURO, A.M.; COSTA, E.M.M.; FERREIRA, A.A.; GASTAL, M.L.A.; GOES JUNIOR, C.D.; MANZAN, D.J.; MARTINS, C.R.; MONTEIRO, J.M.G.; OLIVEIRA, S.A.; RODRIGUES, M.C.M. SEYFFARTH, J.A.S.; WALTER, B.M.T. Comparação do padrão da distribuição espacial em escalas diferentes de espécies nativas do cerrado, em Brasília, DF. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 341-347, set. 2000.

HEDRICK, P.W. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, n. 2, p. 313-318, abr. 1999.

HENTSCHER, C.C. Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene repeat are sensitive to S<sub>1</sub> nuclease. **Nature**, v. 295, p. 714-716, fev. 1982.

HERINGER, E.P. O pequi. **Brasil Florestal**, v. 1, n. 2, p. 28-31, jan.-jun. 1970.

JIN, L.; MACAUBAS, C.; HALLMAYER, J.; KIMURA, A.; MIGNOT, E. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 26, p.15285-15288, dez. 1996.

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, dez. 1998.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, v. 78, n. 2, p. 143-149, 1996.

KHOURI, J. **Avaliação do potencial antimutagênico e antioxidante do extrato aquoso de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Morfologia)-Departamento de genética e Morfologia, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2004.

KIMURA, M.; CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population, **Genetics**, v. 49, n. 4, p. 725-738, abr. 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.75, n. 6, p. 2868-2872, jun. 1978.

LAGERCRANTZ, U. ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates, **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 1111-1115, 1993.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Software Genetic Data Analysis**, versão 1.0 (d16c): Computer program for the analysis of allelic data. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, 2001.

LOPES, P.S.N.; SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; OLIVEIRA, J.M.; ROCHA, I.D.F. Caracterização do ataque da broca dos frutos do pequiizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 540-543, dez. 2003.

LOVE, M. S.; MORRIS, P.; McCrae, M.; COLLINS, R. **Life history aspects of 19 rockfish species (Scorpaenidae: *Sebastes*) from the southern California Bight**. NOAA Technical Reports NMFS-87, Seattle: U.S. Dept. of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, 1990. 38 p.

MARQUES, M.C.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; GAVILANES, M.L.; SOUZA, J.A.; PEREIRA, N.E.; NEGRÃO, I.O. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, Edição Especial, p. 1410-1419, dez 2002.

MELO, C. **Diurnal bird visiting of *Caryocar brasiliense* Camb. in Central Brazil**, Revista Brasileira de Biologia, São Carlos, v. 61, n. 2, p. 311-316, mai. 2001.

MELO, J.T. Efeito do ácido giberélico-GA3 sobre a germinação de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993, Curitiba. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1993. v. 2, p. 760.

MELO JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, v. 66, p.56-65, dez. 2004.

MILLER, M.P. **Software Tool for Population Genetic Analyses (TFPGA)**, versão 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997.

MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, n. 3, p. 654-660, jul. 1991.

MORAN, C. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. **Heredity**, Baltimore, v. 84, n. 4, p. 274-280, jul.-ago. 1993.

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

MULLIS, K.B.; FALLONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. In: Wu, R. (Ed.). Recombinant DNA, Part F. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NAVES, R.V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influências do clima e do solo**. 1999. 206 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

NAVES, R.V.; CHAVES, L.J. Uso e conservação de espécies frutíferas do cerrado. **Gazeta Tecnológica**, Goiânia, 2001, ano: 2, n. 11, p. 3-4, mai. 2001.

NEI, M. Genetics distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v.106, n. 949, p.283-292, mai.-jun. 1972.

NOVICK, R.R.; DICK, C.W.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v.12, n. 11, p. 2885-2893, nov. 2003.

OLIVEIRA, K.A.K.B. **Variabilidade genética entre e dentro de populações de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) do Estado de Goiás**. 1998. 105 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 1998.

OLUFOWOTE, J.O.; XU, Y.; CHEN, X.; PARK, W.D.; BEACHELL, H.M.; DILDAY, R.H.; GOTO, M.; MCCOUCH, S.R. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 370-378, jun. 1997.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A.; What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, Washington, v. 79, n. 2, p. 361-382, mar. 1998.

PASSOS, X S; SANTOS S. C.; FERRI P. H.; FERNANDES O. F. PAULA T. F, GARCIA A. C. & SILVA M. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 6, p. 623-627, nov.-dez. 2003.

PAULA, J.R.; SALES, B.H.N.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA, C.M.A.; LIÃO, L.M.; FERRI, P.H.; FERREIRA; H.D. Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Caryocar brasiliensis* Camb. (Pequi). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Química, 2000. Disponível em: <<http://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/1375-2/index.html>> Acesso em: 18 jun. 2003.

PRANCE, G.T.; SILVA, M.F. **Caryocaraceae**. New York: Hafner Press, 1973. 75 p. (Flora Neotropica. Monograph, 12)

REDOÑA, E.D. MACKILL, D.J. Molecular mapping of quantitative trait loci in japonica rice. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 2, p. 395-403, abr. 1996.

RIBEIRO, J.F. a Importância econômica do pequi. **Cerrado**, v.11, n. 36, p.24-26, 1980.

RIBEIRO. J.F.; RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; PROENÇA. C.B.; FETTILI. J.M.; NOGUEIRA. P.E.; RESENDE, A.V; WALTER, B.M.T.; MUNHOZ, C.B.R.; ALMEIDA, S.P.; FILGUEIRAS, T. Caracterização e manutenção da biodiversidade da flora lenhosa da região do Cerrado. In: Embrapa-CPAC. **Relatório técnico anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1991 a 1995**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. p. 35-37.

RICO, C. RICO, I. HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. Proceedings of the Royal Society of London. Series B **Biological Sciences**, London, v. 263, n. 1370, p. 549-557, mai. 1996.

ROHLF, F.J. **Software NTSYSpc**, versão 2.1: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, New York, 2000.

ROSA, M.E.C. **Ambientes de ocorrência e produção de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) no estado de Goiás**. 2004. 113 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.

SANTANA, J. G.; NAVES, R. V. Caracterização de ambientes de Cerrado com alta densidade de pequizeiros (*Caryocar brasiliense Camb.*) na região sudeste do Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 33, n. 1, p1-10, jan./jun., 2003.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 20, n. 2, p. 211-215, 1992.

SCHLÖTTERER, C.; RITTER, R.; HARR, B.; BREM, G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 15, n. 10, p. 1269-1274, out. 1998.

SILVA, E.C. **Desenvolvimento de emulsões cosméticas utilizando o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*)**. 1994. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

SILVA, D.B. JUNQUEIRA, N.T.V.; SILVA, J.A.; PEREIRA, A.V.; SALVIANO, A.; JUNQUEIRA, G.D. Avaliação do potencial de produção do “Pequizeiro-anão” sob condições naturais na região sul do Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 726-729, dez. 2001.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.

TAUTZ, D.; SCLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 4, n. 6, p. 832-837, dez. 1994.

TELLES M.P.C. **Diversidade genética e estrutura populacional de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) do sudeste de Goiás**. 2000. 129 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.C. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas** (Sociedade Brasileira de Genética, Série Monografias), São Paulo: Editora FCA, 1995. 175 p.

VENCOVSKY, R. Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY, 1997, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: ESALQ-USP, 1997. p. 12-22.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 88, n. 1, p. 1-6, 1994.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, v.8, n. 11, p.1899-1909, nov. 1999.

WIERDL, M.; DOMINAKA, M.; PETES, T.D. Microsatellite instability in yeast: Dependence on the length of the microsatellite. **Genetics**, v. 146, n. 3, p. 769-779, jul. 1997.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. **The American Naturalist**, Chicago, v. 56, n. 645, p. 330-338, jul.-ago. 1922.

WRIGHT, S. The Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, n. 3, p. 395-420, set. 1965.

WU, K.S.; TANSKELY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular & General Genetics**, v. 241, n. 1-2. p. 225-235, out. 1993.

YANG, G.P.; SAGHAI MOROOF, M.A.; XU, C.G.; ZHANG, Q.; BIYASHEV, R.M. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Molecular & General Genetics**, v. 245, n. 2, p. 187-194, out. 1994.

ZHAO, X. KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)(n) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 21, n. 4, p. 607-614, fev. 1993.

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**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 449-457, dez. 2003.