UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS
JULIANE COSTA CABRAL

Estrutura Populacional e Fluxo Gênico de uma População Natural de Castanheira-do-Brasil.

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
NOVEMBRO – 2016

JULIANE COSTA CABRAL

Estrutura Populacional e Fluxo Gênico de uma População Natural de Castanheira-do-Brasil.

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Aparecida Bandini Rossi.

Coorientadora: Drª. Aisy Botega Baldoni Tardin.

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
NOVEMBRO – 2016

ESTRUTURA POPULACIONAL E FLUXO GÊNICO EM UMA POPULAÇÃO NATURAL DE CASTANHEIRA-DO-BRASIL.

JULIANE COSTA CABRAL

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 25 de novembro de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof.ª. Drª Ana Aparecida Bandini Rossi
Orientadora - PGMP-Unemat

Drª. Aisy Botega Baldoni Tardin
Coorientadora – EMBRAPA/Sinop

Prof. Dr. Flávio Dessaune Tardin
PGMP-Unemat

Drª. Joyce Mendes Andrade Pinto,
Membro Externo – EMBRAPA/Sinop

CIP – CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

C117e Cabral, Juliane Costa.
Estrutura populacional e fluxo gênico de uma população natural de Castanheira-do-Brasil / Juliane Costa Cabral. – Sinop, 2016.
50 f.: il.

Orientadora: Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Mato Grosso, Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP).

1. *Bertholletia excelsa*. 2. Marcadores, Microssatélite. 3. Diversidade Genética. 4. Amazônia. I. Rossi, A. A. B., Dra. II. Título.

CDU 631.52(811)

DEDICO

A minha mãe, Ivanete Costa dos Santos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela vida, cuidado e proteção.

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP) pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo suporte financeiro do projeto.

À Embrapa Agrossilvipastoril e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de executar o trabalho de dissertação em suas instalações.

Prof. Drª. Ana Aparecida Bandini Rossi, pelos ensinamentos, oportunidade e paciência durante todos esses anos.

À Drª Aisy Botega Baldoni Tardin, por todo apoio, incentivo e ensinamentos.

Ao Dr. Hélio Tonini, pesquisador da Embrapa-Agrossilvipastoril pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

À Drª Vania Cristina Rennó Azevedo, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

À Luana Della Giustina pela amizade e companheirismo e por todo apoio dado no desenvolvimento da pesquisa.

À Auana Vicente Tiago, Jakeline Santos Cochev e Juliana Dardengo, pela contribuição na realização desta pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela contribuição em minha formação profissional.

Aos colegas de curso pelo companheirismo durante os dois anos de curso,

À todos os pesquisadores e demais funcionários da Embrapa Agrossilvipastoril e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos queridos, Auana, Poliana, Sueellen, Marina, Sheila, Daiane, Ana Paula, Juliana, Cristina, Moisés, Ana, Eliza, Gisele Leila, por dividirem comigo as alegrias, certezas, incertezas, dúvidas, risadas, almoços, jantares... Vocês são ótimos.

À minha família, pelo incentivo e apoio durante todo o curso, especialmente a minha mães Ivanete costa dos Santos que não mediu esforços para eu chegar até aqui.

BIOGRAFIA

Juliane Costa Cabral, filha de Paulo Alves Cabral e Ivanete Costa dos Santos, nasceu em Alta Floresta – MT em 10 de fevereiro de 1991. Em 2008, encerrou o ensino médio na Escola Estadual Profª. Marines Fátima de Sá Teixeira, em 2008 iniciou o Curso Técnico em Edificações pela Secitec, Alta Floresta, o qual concluiu em 2011. Em 2009, iniciou o curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela UNEMAT *campus* de Alta Floresta, o qual concluiu em 2013 sob a orientação da Prof.ª. Drª. Ana Aparecida Bandini Rossi. Em 2015, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – UNEMAT – *Campus* de Alta Floresta, o qual concluiu em 2016.

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO GERAL** 10

2. REVISÃO DE LITERATURA 12

2.1 Distribuição geográfica 12

2.2 Aspectos botânicos 13

2.3 Aspectos reprodutivos 15

2.4 Estrutura populacional 16

2.5 Fluxo gênico 17

2.6 Diversidade genética 19

2.7 Marcadores moleculares 20

3. MATERIAL E METODOS 22

3.1 Área de estudo 22

3.2 Amostragem e coleta de material vegetal 23

3.3 Extração e quantificação de DNA 23

3.4 Amplificações de DNA e genotipagem dos indivíduos adultos e juvenis de *B. excelsa.* 24

3.5 Caracterização dos locos microssatélites 26

3.6 Determinação das distâncias de dispersão do pólen e da semente da população de *B. excelsa* 27

3.8 Estrutura genética populacional 28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

4.1 Caracterização dos locos microssatélites 29

4.2 Comparação da diversidade genética entre individuos adultos e juvenis de *B. excelsa* 31

4.3 Determinação do fluxo gênico da população de *B. excelsa* 33

4.4 Estrutura genética populacional 37

5. CONCLUSÃO 40

6. REFERÊNCIAS 41

RESUMO

Cabral, Juliane Costa; M.Sc.; Universidade do Estado de Mato Grosso; Novembro de 2016. Estrutura Populacional e Fluxo Gênico de uma População Natural de Castanheira-do-Brasil. Orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi. Conselheira: Aisy Botega Baldoni Tardin.

A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) pertence à família Lecythidaceae e ocorre na região Amazônica, suas sementes são muito apreciadas na alimentação e possui elevado valor econômico. A crescente destruição da floresta Amazônica influi negativamente na ecologia de *B. excelsa*, causando isolamento de populações e mudanças nos padrões de distribuição da espécie. Estudos do sistema reprodutivo, dispersão de pólen e diversidade genética são fundamentais para conservação dos recursos genéticos florestais e pode oferecer informações importantes para programas de melhoramento genético. Nesse contexto esta pesquisa objetiva avaliar estrutura genética e fluxo gênico de uma população natural de castanheira utilizando marcadores moleculares microssatélites. O estudo foi realizado em uma parcela 18,8 hectares localizada no município de Itaúba, MT, onde encontra-se grandes formações naturais de *B. excelsa*. Foi amostrado material vegetal de árvores adultas e juvenis, dos quais, foram coletadas amostras de câmbio vascular e tecidos foliares para extração de DNA, as amostras foram genotipados utilizando dez locos microssatélites desenvolvidos para a espécie. Por meio das análises de riqueza alélica, proporção de locos polimórficos, heterozigosidade observada esperada e índice de fixação constatou-se que as duas gerações de *B. excelsa* (adultos e juvenis), apresentam altos níveis de diversidade genética. A heterozigosidade observada foi maior que a esperada o que resultou em valor negativo do índice de fixação indicando ausência de endogamia na população. Foi observada a presença de alelos raros nas duas gerações, oito alelos entre os indivíduos adultos e sete entre os juvenis, sugerindo que a população de *B. excelsa* não está isolada reprodutivamente e que está havendo fluxo gênico externo à população amostrada. A análise de parentesco atribuiu parentais a 77% dos juvenis estudados indicando que os parentais de 23 % dos juvenis estão localizados fora da área experimental. O teste de atribuição de paternidade detectou 0% de autofecundação na população o que está de acordo com os mecanismos de autoincompatibilidade que já foi observado na espécie. Com base na distância entre os parentais foi estimada a distância de dispersão de pólen, que variou de 13 a 1.119 metros, com média de 351 metros, sendo mais frequente até 300 metros. A estrutura populacional com base na análise Bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE permitiu identificar três grupos distintos na população, que foi confirmada pela análise das coordenadas principais. A análise da Variância molecular (AMOVA) revelou que 98% da variabilidade encontra-se distribuída dentro dos grupos e 2% entre grupos. Conclui-se, portanto, que há heterozigosidade e fluxo gênico na população *B. excelsa* e que a diversidade genética detectada encontra-se espacialmente estruturada dentro da população, sendo que quanto mais próximas às árvores, maior é a probabilidade de parentesco.

Palavras-chave: *Bertholletia excelsa*, Marcadores microssatélite, diversidade genética, Amazônia.

ABSTRACT

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) belongs to the family Lecythidaceae and occurs in the Amazon region, its seeds are very appreciated in food and has high economic value. The increasing destruction of the Amazon forest negatively influences the ecology of B. excelsa, causing isolation of populations and changes in patterns of distribution of the species. Studies of the reproductive system, pollen dispersal, and genetic diversity are critical for conservation of forest genetic resources and can provide important information for breeding programs. In this context, this research aims to evaluate the genetic structure and gene flow of a natural chestnut population using microsatellite molecular markers. The study was carried out on a plot of 18.8 hectares located in the municipality of Itaúba, MT, where there are great natural formations of B. excelsa. Plant material was sampled from adult and juvenile trees, from which samples were collected from vascular exchange and foliar tissues for DNA extraction, these individuals were genotyped using ten microsatellite loci developed for the species. By means of the analyzes of allelic richness, proportion of polymorphic loci, expected observed heterozygosity and fixation index, it was verified that the two generations of B. excelsa (adults and juveniles), present high levels of genetic diversity. The observed heterozygosity was higher than expected, which resulted in a negative value of the fixation index indicating absence of inbreeding in the population. It was observed the presence of rare alleles in the two generations, eight alleles between adults and seven juveniles, suggesting that the population of B. excelsa is not reproductively isolated and that there is a gene flow outside the sampled population. The kinship analysis attributed parental to 77% of the juveniles studied, indicating that the parents of 23% of juveniles are located outside the experimental area. The paternity attribution test detected 0% of self-fertilization in the population, which is in agreement with the mechanisms of autoincompatibility that has already been observed in the species. Based on the distance between the parents, the dispersion distance of pollen was estimated, ranging from 13 to 1,119 meters, with a mean of 351 meters, being more frequent up to 300 meters. The population structure based on the Bayesian analysis performed by the STRUCTURE program allowed the identification of three distinct groups in the population, which was confirmed by the analysis of the main coordinates. The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that 98% of the variability is distributed within the groups and 2% between groups. It is concluded, therefore, that there is heterozygosity and gene flow in the B. excelsa population and that the genetic diversity detected is spatially structured within the population, and the closer to the trees, the greater the probability of kinship.

Key words: Bertholletia excelsa, Microsatellite markers, genetic diversity, Amazonia

1. INTRODUÇÃO GERAL

B*ertholletia excelsa* Bonpl., conhecida popularmente como castanheira-do-pará, castanheira-do-brasil e mais recentemente como castanheira-da-amazônia, é uma espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae (Wadt e Kainer, 2009). É considerada uma das plantas mais nobres e valiosas da região Amazônica, devido ao valor econômico da suas nozes que contém uma grande variedade de nutrientes como proteínas, fibras, selênio, magnésio e fósforo (Vilhena, 2004). A utilização da espécie vai além do uso como alimento, também é fonte de matéria-prima na produção de artesanatos, cosméticos e fármacos (Souza, 2006).

A castanha-do-brasil constitui-se em um dos produtos extrativistas de maior importância para as famílias que vivem nas áreas de ocorrência da espécie (Witkoski, 2004). Entre os produtos florestais não madeireiros oriundos do extrativismo, caracteriza-se como um dos mais importantes recursos econômicos da Amazônia, sendo sua semente comercializada internacionalmente, e a coleta é feita com exclusividade em áreas florestais naturais (Mori, 1992; Clay, 1997; Ortiz, 2002). *B. excelsa* pode ser considerada uma espécie chave para avaliar a conservação e desenvolvimento florestal Amazônico, pois apresenta ampla distribuição na região; colheita em florestas naturais, é explorada por diversas comunidades em curto prazo e a baixo custo, tem sólida demanda de mercado; e sua coleta é considerada de baixo impacto ambiental (Zuidema e Boot, 2002).

Uma das alternativas para valorizar a floresta em pé é a comercialização de produtos florestais não-madeireiros (Ortiz et al., 2002). A castanha-do- brasil é reconhecida como um modelo de produto florestal que contribui para a promoção da conservação das florestas. A espécie é responsável pela proteção de milhares de hectares de florestas, pois teve papel fundamental na inclusão destas florestas na categoria de áreas protegidas por recursos manejados do Sistema de Classificação das Áreas Protegidas da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Genéticos). Essa categoria foi criada principalmente por legitimar as reservas extrativistas como um modelo de conservação dos recursos genéticos (Wadt e Kainer, 2009).

A crescente destruição da floresta Amazônica influi negativamente na ecologia da *B. excelsa,* pois afeta a reprodução e dispersão de suas sementes, e a fragmentação de habitat reduz o tamanho efetivo de suas populações e aumenta o isolamento espacial (Fearnside, 2006). Dentre os parâmetros genéticos populacionais que fornecem informações relevantes para projetos de conservação de espécies estão: o fluxo gênico, medidas de diversidade genética e o grau de estruturação genética espacial das populações (Yong et al., 2001). A conservação da diversidade genética é uma pré-condição necessária à manutenção de todos os outros níveis da biodiversidade (Boyle, 2000; Namkoong et al., 2002). A base da conservação de espécies é a manutenção da variabilidade genética (Yeeh et al., 1996). Sua descrição e distribuição são fundamentais para o estabelecimento de medidas visando à conservação (Rajora et al., 2000; Moura, 2005).

O desenvolvimento de metodologias de marcadores moleculares baseados em polimorfismo ao nível de sequência de DNA é uma ferramenta para caracterizar e avaliar recursos genéticos, especialmente para entender a estrutura e organização da diversidade genética das populações e seu monitoramento ao longo do tempo (Figueira e Cascardo, 2001). Os marcadores microssatélites têm sido utilizados, como uma ferramenta eficaz para a compreensão de muitas áreas da genética, como estrutura genética de populações, fluxo gênico, viabilidade de populações, além de permitir a quantificação dos efeitos da fragmentação de habitats e contribuir para o estabelecimento de estratégias para a conservação de espécies (Lemes et al., 2003).

Estudos de diversidade e estrutura genética de *B. excelsa* já foram realizados com sucesso utilizando marcadores RAPD (Serra, 2006) e microssatélites (Sujii, et al., 2015; Vieira, 2014). Entretanto ainda são poucos os estudos realizados com a espécie. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética, estrutura populacional e fluxo gênico em uma população de *B. Excelsa* localizada em floresta nativa no Norte do Estado do Mato Grosso*,* por meio de marcadores moleculares microssatélites.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distribuição geográfica

A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma espécie típica de mata alta de terra firme, (não alagável), e que se desenvolve em regiões de clima quente e úmido, principalmente em solos pobres em nutrientes, bem estruturados e bem drenados. Apresenta maior distribuição em regiões onde predominam os tipos climáticos tropicais chuvosos com a ocorrência de períodos de estiagem bem definidos (Müller et al.,1995; Clement et al., 2000).

A área de ocorrência da castanheira é ampla e abrange a Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guiana. Porém, as formações de florestas mais densas ocorrem no Brasil, principalmente nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Pará, Amapá, Roraima, e Mato Grosso, como pode ser observado na figura 1 (Lorenzi, 2002; Zuidema, 2003; Tonini et al., 2014).

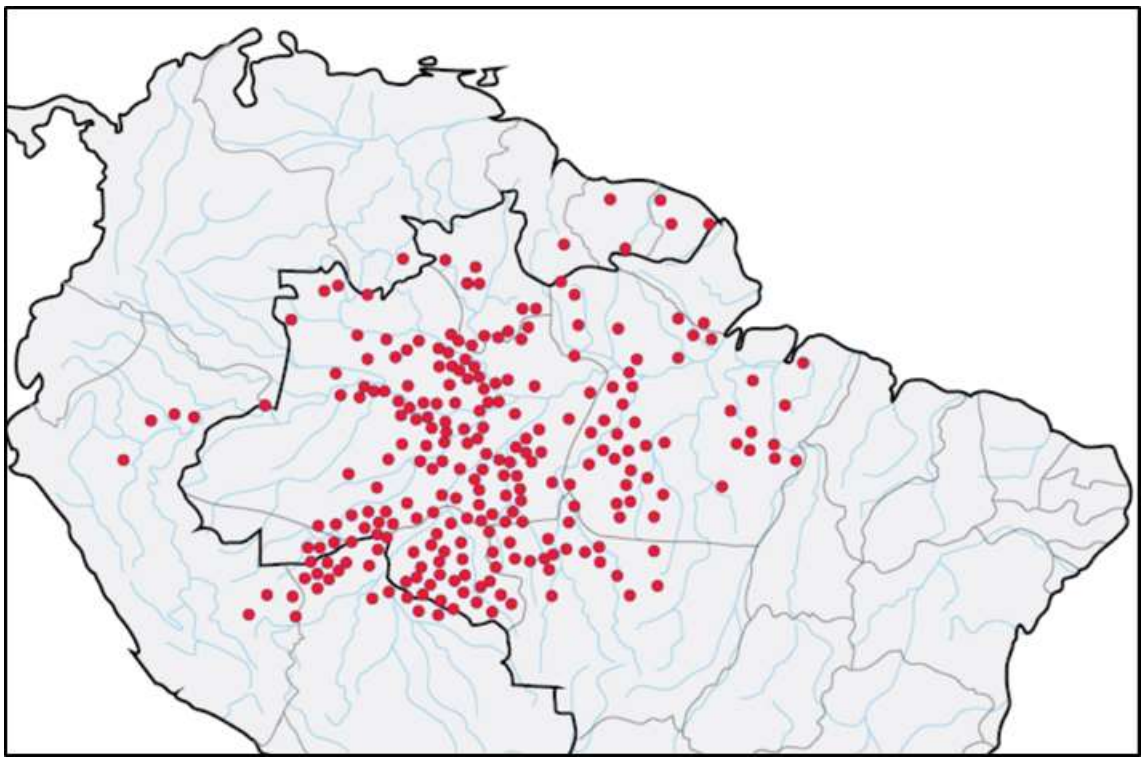

Figura 1. Distribuição natural de castanheira-do-brasil na Amazônia. Fonte: Scoles e Gribel, (2011).

2.2 Aspectos botânicos

B. excelsa é uma angiosperma, da classe das dicotiledôneas, ordem Myrtiflorae e família Lecythidaceae. Foi descrita por Bonpland, no ano de 1807, e representa a única espécie do gênero *Bertholletia* (Mori e Prance, 1990; Wadt e Kainer, 2009). As árvores adultas geralmente são emergentes e suas copas estão acima do dossel da floresta com altura entre 30 e 50 metros (Figura 2), na fase adulta e com média de dois metros de diâmetro à altura do peito (Salomão et al., 1995; Lorenzi, 2002; Zuidema, 2003).

O caule é retilíneo, cilíndrico e desprovido de ramos, apresenta casca escura, fendida e ramos escuros nas extremidades (Figura 2A). Estimativas baseadas na taxa anual de incremento diamétrico sugere que alguns indivíduos podem ultrapassar mil anos de idade (Salomão, 1991).

Figura 2. Detalhe de um castanhal natural. A) Árvores de *B. excelsa*, nos agrupamentos conhecidos como castanhais; B) aspecto geral do caule de B. *excelsa.*

As folhas das castanheiras são simples, espaçadas, alternadas, pecioladas, verde-escuras na parte superior e pálidas na parte inferior, com nervura média levemente aveludada na parte superior, com 25 a 35 cm de comprimento e 8 a 12 cm de largura (Cavalcante, 1996).

As flores são dispostas em inflorescência, possui seis pétalas tubulosas, grandes, côncavas e decíduas, de coloração branco-amarelada (Figura 3), oferecendo néctar e pólen como recompensa aos visitantes florais (Moritz, 1984). A estrutura da flor oculta os estames e o estigma restringindo a entrada dos insetos e seleciona polinizadores específicos com vigor físico e tamanho compatíveis, para recolher o pólen ou néctar (Maués, 2002).

Figura 3. Detalhe das inflorescências e das flores de *B. excelsa*.

O fruto comumente chamado “ouriço” pode pesar de 500g a 1.500g é uma cápsula globulosa, quase esférica, medindo de 8 a 15 cm de diâmetro cuja casca é espessa e lenhosa, de cor castanha, contém de 12 a 25 sementes, com massa de 4 a 10 g cada uma (Mori e Prance, 1990). Müller (1995) caracteriza o aspecto morfológico das sementes das castanheiras como de formato triangular anguloso com casca bastante dura e rugosa. A amêndoa presente no interior da semente é utilizada como alimento e considerada uma das proteínas vegetais mais completas, possuindo alto valor nutritivo, é rica em cálcio e fósforo, possui elevado índice de magnésio e potássio (Vilhena, 2004).

2.3 Aspectos reprodutivos

A fase reprodutiva da castanheira-do-brasil inicia-se com a emissão dos botões florais, o período reprodutivo varia em toda Amazônia. Tonini et al. (2014), em estudos de castanhais nativos em Roraima observaram que a fase reprodutiva inicia entre os meses de outubro e dezembro com máxima atividade entre janeiro e fevereiro. Lima (2009), estudando a biologia reprodutiva de castanheira no Acre, verificou que o pico de florescimento ocorreu no mês de dezembro. O início da florescimento varia de acordo com a região, a floração é anual, longa e sincrônica e ocorre predominantemente, durante o período de menor precipitação, o que caracteriza a família Lecythidaceae (Clement, 2000; Leão e Carvalho, 2001; Tonini et al. 2014).

A castanheira é uma planta predominantemente de polinização cruzada, de acordo com Muller et al. (1980) e Maués (2002), as flores da castanheira são polinizadas por abelhas grandes, robustas e de língua comprida da família Apidae, pertencentes aos gêneros *Bombus (Bombini), Centris e Epicharis (Centridini), Eulaema (Euglossini) e Xylocopa (Xylocopini)*. A espécie é altamente dependente da ação dos polinizadores para assegurar a produção de frutos (cavalcante et al., 2012)

A frutificação inicia no período de menor precipitação, dependendo da região e do ano, os frutos apresentam um período de maturação de 14 a 15 meses e a dispersão dos frutos ocorre na época chuvosa (Cornejo, 2003; Tonini et al., 2014).

Durante o desenvolvimento de novos frutos, a castanheira conserva os frutos velhos sendo comum encontrar frutos de diferentes estágios de desenvolvimento em uma mesma planta durante todo o ano (Moritz, 1984; Cornejo, 2003; Tonini et al., 2014). O número de frutos produzidos por uma mesma árvore varia de um ano para o outro, isso se deve ao grande período de maturação dos frutos, porem a média de

produção de frutos da população não varia muito entre os anos (Wadt et al., 2005). No Estado do Acre, um estudo avaliou a produção de 140 castanheiras de 2002 a 2008, obteve produção média de 71,3 frutos com 9,3 Kg de sementes por árvore (Wadt e Kainer, 2009). Tonini et al. (2008), avaliou a produção de 27 castanheiras no Estado de Roraima, o número médio de frutos produzidos por árvore foi de 36,4, e média de 5,4 kg de sementes. Na Bolívia pesquisadores monitorou a produção de 40 castanheiras, de 1994 a 1998, a produção média foi de 184 frutos por árvore e 17g de sementes (Zuidema, 2003). Esses estudos revelam a grande variação na produção de frutos de castanheira nas diferentes regiões da Amazônia.

A castanheira é a única espécie da família Lecythidaceae com frutos funcionalmente indeiscentes, ou seja, eles não se abrem para liberar as sementes, as quais amadurecem dentro do próprio ouriço (Mori e Prance, 1990). A primeira fase de dispersão de fruto é gravitacional, destacando-se a capacidade dos frutos pesados de cair no chão sem quebrar a sua estrutura lenhosa (Zuidema e Boot, 2002).

A dispersão e a predação dos frutos de *B exelsa* são realizadas principalmente pela cutia (*Dasyprocta aguti*), são os únicos roedores capazes de roer a espessa parede de pericarpo de frutos recém-caídos para acessar as sementes internas (Peres et al. 1997; Haugaasen et al., 2012) Algumas sementes são consumidas imediatamente, outras são armazenadas para posterior consumo ou abandonadas em outras áreas, onde germinam (Maués, 2002). As cutias desempenham um papel importante na dispersão e na regeneração natural dessa espécie (Prance e Mori 1979; Baider 2000). Embora alguns estudos sugiram influência do homem na distribuição dos castanhais de (scoles & Gribel 2011). Para Shepard jr. e Ramirez (2011), existem fortes evidências de que a distribuição geográfica desta espécie na Amazônia esteja associada à atividade de populações humanas pré-colombianas (Shepard jr. e Ramirez, 2011).

2.4 Estrutura populacional

As populações de castanheira se estabelecem melhor em locais secos, sendo característica de mata de terra firme não inundável (Araújo, 2001; Müller, 1995). As árvores de *B. excelsa* ocorrem em agrupamentos conhecidos como castanhais que pode conter de poucos a centenas de indivíduos, a densidade de castanheiras por hectare varia consideravelmente em toda a Amazônia. (Mori e Prance, 1990; Peres e Baider, 1997; Salomão, 2009). Para Mori e Prace (1990), a densidade das

castanheiras em forma de aglomerados seria consequência da dependência de clareiras para seu crescimento juvenil. Peres e Baider, (1997) afirma que os aglomerados de castanheiras podem ser explicados por um padrão de dispersão de curta distância promovida por cutias, sendo raros os casos de dispersão a longa distância.

Neves et al. (2016) estudando a estrutura populacional de castanheiras nos Estados do Acre e Amapá, observou densidade média de 2,2 indivíduos por hectare no Acre e 9,0 indivíduos por hectare no Amapá. Já em estudos realizados por Tonini el al. (2008) em Roraima, a densidade variou de 3,7 a 12,9 indivíduos por hectare. Essa distribuição é resultante de vários fatores que interagem entre si, como o tipo de solo, estresse hídrico, intensidade luminosa, polinizadores, dispersores, predadores e espécies competidoras são algumas das variáveis capazes de afetar o padrão de distribuição espacial de uma espécie (Budke et al., 2004).

O padrão de distribuição, agrupado ou disperso pode ser resultante da tipologia florestal das áreas de ocorrência das castanheiras. Na região Sudeste da Amazônia (Acre e Bolívia), predomina a floresta aberta com maiores níveis de luminosidade que favorece a regeneração natural resultando em padrão de distribuição espacial mais disperso. Em contraste com as florestas densas, onde o dossel é alto e contínuo a castanheira é dependente da formação de clareiras para obter nível de luminosidade suficiente resultando em uma distribuição espacial mais agrupada (Wadt e Kainer 2009).

2.5 Fluxo gênico

O fluxo gênico definido como o movimento de genes em populações, termo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra (Slatkin, 1987; Neigel, 2002). Jordano (2010), afirma que *Plantas permanecem paradas, mas seus genes não*. Nas plantas, o fluxo gênico é realizado pelo movimento de pólen e de semente, estes dois processos de dispersão são de importância fundamental na estruturação genética das populações (Zucchi, 2002; Martins et al., 2011). O movimento de genes mediado por pólen é importante para promover a diversidade genética dentro e entre populações. Já a dispersão de sementes é o fator determinante para a colonização de novos ambientes. (Barluenga e Meyer, 2010). A dispersão por pólen envolve o movimento somente de genoma haplóide e por semente, do genoma diplóide, proveniente do indivíduo doador de

pólen e do dispersor de semente. (Medeiros, 2010). O fluxo gênico não somente influência a estrutura genética, mas também define os limites da própria população (Nason e Hamrick 1997). O fluxo gênico pode ser quantificado por medidas diretas e indiretas Os métodos indiretos baseiam-se nas análises da estrutura genética de populações (estimativas de Fst, alelos privados e auto-correlação espacial) e referem-se ao fluxo gênico passado. Os métodos diretos referem-se ao fluxo gênico contemporânio e são inferidos através das ánalises de parentesco (maternidade e paternidade) (Zucchi, 2002; Ashley, 2010).

Uma das maneiras de estimar os valores de fluxo gênico indireto é baseada nas estatísticas F de Wright, que através do valor do Fst avalia o grau de estruturação genética das populações (Neigel, 2002). As medidas de Fst é uma ferramenta que auxilia a estimar o número de subpopulações geneticamente distintas na população, estimativas de diferenciação populacional, número de agrupamento de indivíduos geneticamente distintos, estimativas de fluxo gênico aparente, efeito relativo de isolamento e migração, atual e histórico tamanho efetivo populacional (Neigel, 2002; Balloux e Moulin, 2002).

A estrutura genética espacial pode ser identificada a partir da análise estatistica de autocorrelação espacial (Vekemans e Hady 2004), onde é possivel estabelecer correlação entre o parentesco e a distância entre indivíduos de uma população.

As análises de parentesco é uma excelente ferramenta para definição da extensão e magnitude do fluxo gênico em populações naturais (Aldrich et al 1998). A ánalise consiste na utilização de locos gênicos para identificar o provável parental de um conjunto de candidatos adultos e reprodutivos da população e compara-los com os genótipos de progênies oriundas de polinização natural (Ouborg et al., 1999; Zucchi, 2002). Uma vez que o parental é identificado, o padrão do movimento de pólen dentro da área estudada pode ser determinado (Hamrick e Schanabel,1985; Zucchi, 2002; Azevedo, 2007). Já a frequência de alelos encontrados nos juvenis, mas não na população parental, corresponde á estimativa da dispersão de sementes da população (Ouborg et al,. 1999). A determinação de dispersão de pólen e sementes dentro de populações tem sido eficientemente conduzida através de estudos genéticos baseados em dados de marcadores moleculares (Bittencour e Sebbenn, 2007; Garcia et al., 2007; Bacles e Ennos, 2008).

2.6 Diversidade genética

Diversidade genética pode ser definida como a variação de sequências genômicas nos indivíduos de uma mesma espécie. O estudo de diversidade genética é o processo pelo qual a variação entre populações, ou entre indivíduos de uma população é analisada por meio de um método específico ou por uma combinação de métodos. Que pode ser baseada em características agronômicas, morfológicas ou em técnicas de marcadores moleculares (Pereira et al., 2016).

A avaliação da diversidade genética em populações naturais é importante para o estudo de especiação florestal e para a conservação dos recursos genéticos (Buckley et al., 1988). Informações à respeito da distribuição e variabilidade genética são essenciais em programas de melhoramento genético, pois é necessário um conhecimento detalhado da diversidade genética para obtenção de genótipos superiores (Milach, 1998). A diversidade genética pode ser quantificada de diversas maneiras, os principais parâmetros são: número de alelos por loco, número de alelos efetivos, número raros e exclusivos, conteúdo médio de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_o), e esperada (H_e), coeficiente de fixação/endogamia (f), são alguns dos descritores que ajudam a caracterizar uma população.

O número de alelos encontrados por loco é uma estimativa de grande importância, pois quanto maior o número de alelos presentes em uma população, maior é a sua diversidade (Petit et al., 1998). A estimativa de frequência alélica é fundamental nos estudos de genética de populações, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pelas mudanças nas suas frequências gênicas (Nei, 1978). A frequência de heterozigotos na população também é uma medida da diversidade, pois cada heterozigoto carrega diferentes alelos, os quais demonstram a existência de variação genética na população (Weir, 1996). O parâmetro H_e diz respeito à probabilidade de dois gametas, tomados ao acaso em uma população terem alelos diferentes em determinado loco, sendo definida como a diversidade de Nei (1973), esperada, segundo o princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O parâmetro H_o representa a real taxa de indivíduos heterozigotos na população estudada (Azevedo, 2007).

Informaçãoes à respeito de como a diversidade genética está estruturada no espaço geográfico é extremamente importante para o manejo e conservação dos recursos genéticos florestais (Epperson, 1992). A estrutura genética espacial refere-se à distribuição espacial dos genótipos dos indivíduos dentro da população (Hamrick

e Loveless, 1986). O conhecimento da estrutura genética é fundamental para estabelecer estratégias de amostragem em populações naturais (Caballero et al., 2010), permite estimar a área viável para conservação, intensidade ideal de coleta de sementes e distância mínima de coleta entre matrizes para fins de conservação *in situ* e *ex situ* (Epperson, 1992).

O avanço das técnicas de biologia molecular tem revolucionado as análises genéticas voltadas à conservação. Marcadores moleculares capazes de detectar polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) e genotipagem por sequenciamento (GBS – Genotype by Sequencing), realiza inferências estatísticas robustas com grande quantidade de informações (Avise, 2010).

2.7 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são definidos como sequências identificáveis de DNA, encontradas em localizações específicas do genoma, transmitidas pelas leis comuns de herança (Semagn et al., 2006). São úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder de análises genéticas. A vantagem dos marcadores moleculares sobre os dados fenotípicos está, na possibilidade de comparar genótipos de diferentes ambientes, estágio de desenvolvimento e a possibilidade de detectar polimorfismo em todo o genoma (Caixeta, 2016).

A avaliação da variabilidade genética sempre foi de interesse dos geneticistas, que desenvolveram vários métodos para detectá-la e analisá-la. A introdução das técnicas de eletroforese de isoenzimas revolucionou a genética de populações na década de 1950 (Zucchi, 2002). Em meados da década de 1980, o pesquisador britânico Kery Mulis descobriu um processo eficiente de multiplicar *in vitro* milhões de cópias de um segmento de DNA. Trata-se da reação em cadeia da polimerase, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Essa reação se baseia em ciclos de replicação *in vitro* da molécula de DNA, onde cada nova molécula sintetizada em um ciclo é utilizada como molde no ciclo seguinte resultando em aumento exponencial (Mullis e Falona, 1987). A descoberta possibilitou a visualização de fragmentos específicos de DNA, após sua produção em grande quantidade.

A facilidade, rapidez e sensibilidade da PCR possibilitaram o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares de diversas classes como: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR

(Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), entre outros, o que provocou grande impulso na geração de dados moleculares de várias espécies (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Caixeta et al., 2016).

O melhoramento genético de plantas foi impulsionado pelo uso de marcadores moleculares (Guimarães, et al., 2016), que tornou-se parte da rotina dos programas de melhoramento com objetivo de acelerar e otimizar o processo de desenvolvimento de novos cultivares (Caxieta et al., 2016). Atualmente, existe uma grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diferentes espécies vegetais.

Marcadores do tipo microssatélite também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*), são formados por sequências de uma a seis bases de comprimento repetidas em série (Jacob et al., 1991; Tóth et al., 2000; Ferreira Grattapaglia, 1998). Sequências repetitivas são importantes ferramentas para análises genéticas, uma vez que oferecem a possibilidade de amostrar simultaneamente um grande número de locos genéticos polimórficos dispersos no genoma (Azevedo, 2007). Os microssatélites estão presentes, em regiões codificadoras e não codificadoras; possuem herança codominante, o que discrimina homozigotos de heterozigotos; são multialelicos, e constitui uma das classes de marcadores mais polimórficos disponíveis atualmente (Schlötterer e Pemberton 1998; Caxieta et al., 2016).

A grande limitação dos microssatélites está na necessidade de isolar e desenvolver marcadores especificos para cada espécie, sendo necessário ter conhecimento prévio das sequências do genoma da espécie em estudo ou das partes que envolvem os microssatélites de interesse. O que torna o desenvolvimento demorado e trabalhoso com alto custo. No entanto, essa desvantagem é compensada pela facilidade e eficiência do uso desse marcadores. (Caixeta et al., 2016). Os SSRs podem ser automatizavéis em sistemas multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Itaúba, MT, onde se encontra grandes formações naturais de *B. excelsa*. A área experimental está localizada a aproximadamente 30 Km de Itaúba, na área de reserva legal da Fazenda Santo Ângelo, pertencente ao Grupo Dal Pai. Foi instalada na área uma parcela de 18,8 hectares (400 m x 470 m). foram amostradas castanheiras com DAP (diâmetro a altura do peito) ≥ 10 cm Cada indivíduo foi identificado através de numeração com placas de alumínio e georeferenciadas, com base nas informações das coordenadas geográficas obtidas por Sistema de Posicionamento Global (GPS). Foram amostrados também 10 castanheira localizadas fora da parcela, conforme demostrado na figura 4.

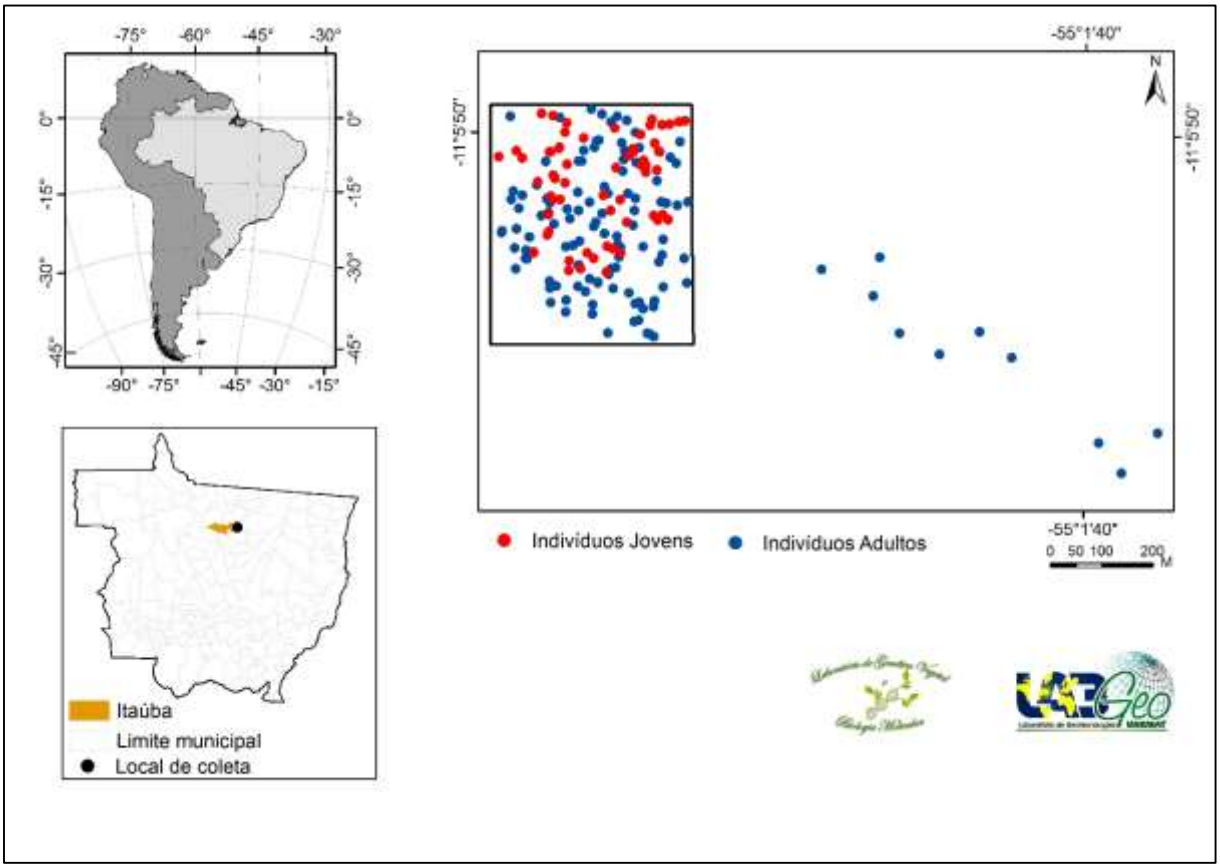

Figura 4. Localização geográfica da área de estudo e distribuição dos indivíduos adultos e juvenis na parcela amostrada.

3.2 Amostragem e coleta de material vegetal

A amostra total consistiu-se 198 indivíduos, sendo 125 adultos, (DAP ≥ 50 cm), e 73 juvenis (DAP < 50 cm). Esta classificação foi realizada com base em Wadt et al. (2005), que relatam que castanheiras pertencentes à classes abaixo de 50 cm de DAP são árvores imaturas, ou seja, não produtivas (juvenis), e nas classes acima de 50 cm de DAP são encontradas árvores em processo de consolidação da produção (adultas).

Um disco de câmbio vascular foi extraído de cada árvore e acondicionado em microtubos de 2,0 mL contendo tampão de transporte (300 µL de CTAB 2%; 700 µL de etanol absoluto). O material foi mantido a -20ºC até a extração de DNA. As análise laboratoriais foram realizadas nos laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop MT, e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília DF.

3.3 Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico total foi extraído a partir de material foliar e de câmbio vascular, seguindo o método CTAB, proposto por Doyle e Doyle (1987), com modificações de Machado et al. (2002), que utiliza a máquina Fastprep- BIO 101 SAVANT para a trituração do material vegetal ao invés de nitrogênio líquido.

A qualidade do DNA extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e corado com brometo de etídio na concentração de 0,6 ng µL -1, (figura 5). A quantificação do DNA foi realizada em espectofotômetro para pequenos volumes (Thermo scientific) e as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 3 ng/µL.

Figura 5. Resultado da eletroforese em gel de agarose a 0,8% com amostras de DNA extraído de 15 árvores de castanheiras.

3.4 Amplificações de DNA e genotipagem dos indivíduos adultos e juvenis de *B. excelsa.*

Para genotipagem das castanheiras, amostras de DNA foram submetidas à amplificação via PCR (reação de polimerização em cadeia) utilizando 10 iniciadores (*primers*) microssatélites desenvolvidos para a espécie, dos quais quatro foram desenvolvidos por Sujii et al. (2013), identificados como “Bet” e seis por Reis et al. (2009), identificados como “Bex” (Tabela 1). De acordo com Reis et al. (2009) e Sujii et al. (2013), Os locos “Bet” e “Bex” não apresentam desequílibrio de ligação. A ligação entre os locos interfere nos resultados.

Os marcadores microssatélites são classificados em perfeitos (repetições de um motivo sem interrupção), e imperfeitos (possuem um ou mais nucleotídeos interferindo na ordem das repetições) ou compostos (dois conjuntos de repetições unidos) (Weber e May, 1989). Dos 10 iniciadores utilizados neste estudo 7 são classificados como Simples Perfeito e 3 como Composto Perfeito.

Tabela 1. Locos microssatélites que foram amplificados nos indivíduos de *B. excelsa* da população em estudo

Locos	Motivo	Classificação	Sequência do iniciador (5’ – 3’)
Bet12	$(TC)_7$	Simples Perfeito	F: ATAAGGACCGCCCATCATC R:ATAGCGAGAGCAACCTTTGAAC
Bet14	(AG)15	Simples Perfeito	F: GTGTACTTCTCTGGTTGGGGC R: CCCGAGTTCATTACCCAAACT
Bet15	(AG)18 (AGA)13	Composto Perfeito	F: ACTGCCATCACCAGCATGTAG R: GTCCCTTGTGGTCTCTCACAAT
Bet16	(CT)17 (CCCT)3	Composto Perfeito	F: TTGATCTTCGCAAGGTCGGT R: ACTTCCTCAATCCATCGAGT
Bex02	(CT)8(CA)9 (CT)5(CA)2	Composto Perfeito	F: GCCATGTTCTCTACAGTCTC R: AGTCGGACATCCTTCGTGCT
Bex09	(CT)32	Simples Perfeito	F: TATTCCATGGTCCTCCGT R: AGTCAATCATCTTCAAGAGT
Bex22	(CT) 38	Simples Perfeito	F: GCATTCTCTCATTTTCGCTTG R: CCCTAGCAATCGTCGTCTTC
Bex27	(GA)20	Simples Perfeito	F: ACTGTTCTGATCCGCCATGT R: TTTCGACCGTTCAAATACG
Bex33	(CT)37	Simples Perfeito	F: CAAGTCTCTGACTCATCGCCTA R: ACCAGGTTCAGCAGACGTTC
Bex37	(CT)19	Simples Perfeito	F: TGCATGCTATGTTTCATTGCT R: CACGCAACCTCACAGTCTTG

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 12 µL, contendo 3 µL de DNA (3 ng/µL); 1,2 µL de tampão PCR 10x (10x, 10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl); 1,2 µL de dNTP (2,5 mM); 1,92 µL de BSA (2,5 mg/mL); 0,24 µL

de Taq DNA Polimerase (5 U/µL), 1,5 µL de cada *primer* (1 µM) e 1,44 µL de água ultra-pura.

As amplificações foram executadas em termociclador *APPLIED BIOSYSTEMS* modelo Veriti sobre as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94ºC por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: 1 minuto para desnaturação a 94ºC; 1 minuto para anelamento a 64ºC e 30 segundos para extensão a 72ºC. A extensão final foi realizada a 72ºC por sete minutos (Sujii et al., 2013).

Para a confirmar a amplificação, 5 µl do produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (1mg/ml), e visualizado em Transiluminador. As imagens do gel foram registradas com fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System (Kodak). O produto da PCR foi diluído em água ultra-pura para a concentração de 3 ng/µL.

A separação dos fragmentos foram feitas com analisador automático de DNA ABI 3700 (*Applied Biosystems*), no qual a corrida eletroforética é feita através de capilares preenchidos com polímero. Esse tipo de equipamento permite a montagem de conjuntos *multiplex* de *locos*, ou seja, a análise de mais de um loco por corrida. A PCR foi realizada individualmente para cada par de primer, porém, devido à marcação com as fluorescências hexacloro-6-carboxifluoresceina (HEX) e 6-carboxifluoresceina (FAM), as eletroforeses aconteceram na forma multiplex e duplex. Os locos que não teve sobreposição na amplitude de amplificação a eletroforece também foi realizada no sistema duplex e multiplex.

Foram montados conjuntos duplex e multiplex de locos amplificados com *primers* marcados com fluorocromos diferentes (Tabela 2). A alta precisão obtida com a utilização desse tipo de equipamento é devida à possibilidade de misturar os fragmentos a serem analisados juntamente com o marcador padrão de peso molecular, graças à marcação com fluorocromos. Os locos analisados em sistema duplex e multiplex estão descritos na Tabela 2. O loco Bex 27 não foi analisado em sistema multiplex.

Tabela 2. Relação dos conjuntos duplex e multiplex utilizados nas amplificações dos indivíduos de *B excelsa*

Conjunto multiplex 1	**Conjunto duplex 2**	**Conjunto duplex 3**	**Conjunto duplex 4**
Bex02 (6-FAM)	Bet12 (6-FAM)	Bex22 (HÉX)	Bex33 (6-FAM)
Bex09 (6-FAM)	Bet16 (HÉX)	Bex37 (6-FAM)	Bet14 (6-FAM)
Bet15 (HÉX)			

Fluorescências utilizadas para marcação de cada iniciador FAM (Azul), HÉX (verde).

Os conjuntos duplex e multiplex foram constituídos de 1 µL de PCR (3 ng/µL), 10 µL de HiDi e 1 µL de marcador ROX. Essa reação foi desnaturada em termociclador a 95º C por 5 minutos, após a desnaturação a reação foi mantida em gelo até o momento da eletroforese.

Os tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com um DNA de tamanho conhecido Rox 500 utilizando o programa GeneMapper v.4.1 (Figura 6). O arredondamento dos tamanhos alélicos foi realizado através do software AlleloBin (Prasanth et al., 2006). A partir da detecção dos tamanhos dos fragmentos amplificados com cada par de *primers* para cada indivíduo, foi gerada uma planilha utilizada para as análises e estimativas.

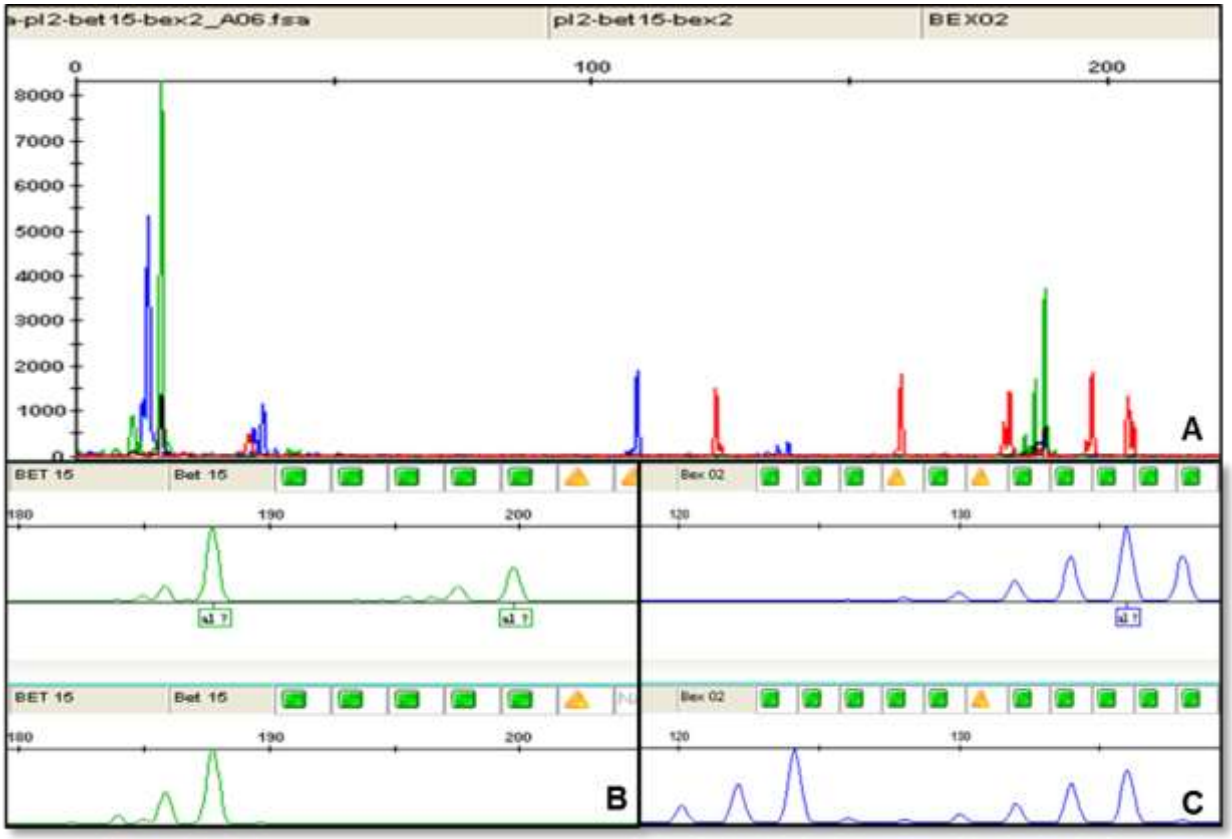

Figura 6. Sistema *duplex* de *loci* em analisador automático de fragmentos ABI 3700. A) Imagem da detecção de picos de fluorescência dos fragmentos (verde e azul) e do marcador interno (vermelho); B e C) detecção dos tamanhos de fragmentos amplificados com Bet15 e Bex 02, respectivamente, com GeneMapper.

3.5 Caracterização dos locos microssatélites

A caracterização dos locos microssatelites, foi realizada com base nas estimativas de: número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e

esperada (H_e) sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e índice de fixação (*F*), conforme Weir (1996). Essas análises foram realizadas no software PowerMarker V.3.25 (Liu e Mouse, 2005).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC–*polymorphism information content*), proposto por Anderson et al. (1993), foi calculado em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência na população estudada. Os valores de PIC para cada marcador foram determinados pela equação:

$$\mathrm{PIC_i} = 1 - \sum_{j=1}^{n} \mathrm{P_{ij}^2}$$

Nesta expressão, Pij é a frequência do alelo "j" no marcador "i" (a soma se estende por todos os alelos). O cálculo foi baseado no número de alelos detectados por marcador para um determinado loco e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos 191 genótipos analisados. O valor do PIC varia de "0", para perfis monomórficos, até "1", para perfis altamente polimórficos.

3.6 Determinação das distâncias de dispersão do pólen e da semente da população de *B. excelsa*

Para verificar a distância percorrida pelo pólen e pela semente na população estudada, foram identificados os prováveis pais dos 73 indivíduos juvenis, oriundos da regeneração natural na floresta. Para a determinação do parentesco foi utilizado o programa Cervus 3.0.3 (Kalinowski et al., 2007). Esse método é utilizado para a determinação de ambos os parentais quando nenhum dos dois é conhecido e identificar, portanto, o par mais provável de indivíduos à parentais. Essa análise é realizada a partir dos locos microssatélites obtidos para esses indivíduos. Para isso, todos os indivíduos adultos da população foram testados como possíveis parentais dos indivíduos juvenis.

O software avalia o parentesco em três etapas. 1º Análise de frequência de alelos dos pais e progênies em estudo; 2º simulação de parentesco com base nos dados de frequência de alelos observados que são usados para atribuir um limite de confiança na atribuição de parentesco; 3º estimativa das pontuações LOD (*logarithm of the likelihood ratio*) para o conjunto de progenitores e progênies especificados e

atribuição de parentesco. As análises de parentesco determinadas pela estatística Δ, corresponde à diferença entre o LOD logaritmo da razão de verossimilhança do parental mais provável, menos o LOD do segundo candidato a parental mais provável. Para obter os valores críticos de Δ foram conduzidas simulações com todos os genótipos adultos reprodutivos como candidatos a parental, usando 10.000 simulações. Foram utilizados os níveis de confiabilidade de 95 % como restrito e 80% como relaxado, conforme sugestão de Marshall et al. (1998).

Após a determinação dos parentais de cada juvenil, foi possível identificar quais vieram de autofecundação, e quais vieram de fecundação cruzada. Além disso, como todos os indivíduos da população tiveram suas posições espaciais conhecidas foi possível determinar a distância percorrida pelo pólen, ou seja, a distância entre os parentais de um determinado juvenil; e a distância percorrida pela semente, ou seja, a distância entre cada parental e o determinado juvenil. Foi determinado que a menor distância seria entre a mãe e o juvenil, considerando que o deslocamento do dispersor da semente seja menor que o do polinizador.

A estrutura genética espacial identificada através do coeficiente de coancestria (θxy), entre pares de árvores, foi estimado para cada uma das 10 classes de distância pré-estabelecidas. O intervalo de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente médio de coancestria estimado, para cada classe de distância, foi construído com base no erro padrão da média das estimativas, obtido por reamostragem *jackknife* entre locos. O coeficiente de coancestria e o erro padrão foram estimados usando o programa SPAGeDi versão 1.3 (Hardy e Vekemans, 2002).

3.8 Estrutura genética populacional

Para determinar a estrutura genética na população de *B. excelsa* em estudo, as 198 árvores foram analisadas em conjunto independente do estágio de desenvolvimento (adultos ou juvenis).

O programa STRUCTURE 2.2 (Prichard et al., 2000) foi utilizado para inferir o número de grupos (K) que melhor explica os dados por meio de um método de agrupamento Bayesiano. O número de grupos *K* foi ajustado para variações de 1 a 5. Os parâmetros utilizados nas análises foram 200.000 passos de *burn-in* e 500.000 interações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). Cada simulação foi replicada 20 vezes como recomendado (Evano et al., 2005). Para definição do K mais

provável em relação aos propostos foram utilizados os critérios propostos por Pritchard e Wen (2004) e também o critério proposto por Evano et al. (2005).

Assumindo o número de grupos resultante da análise Bayesiana, o programa GenAlEx 6.5® (Peakall e Smouse 2006) foi utilizado para realização das análises de diversidade genética nos grupos, análise das coordenadas principais (PCA) e da análise de variância molecular (AMOVA) (Excofier et al., 1992) com a variação genética sendo particionada em dois níveis: entre grupos (que correspondem aos grupos obtidos pelo Structure) e dentro dos grupos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos locos microssatélites

Os locos microssatélites apresentaram um total de 38 alelos, variando de 2 (Bet16 e Bex09) a 7 (Bex33) alelos, com média de 3,8 alelos por loco (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas da diversidade genética entre indivíduos de *B. excelsa*, obtidas com 10 *Primer* de microssatélites

Locos	Amplitude de amplificação (pb)	A	N	H_O	H_e	PIC	F
Bet12	112-118	3	189	0,646	0,582	0,498	-0,077
Bet14	105-121	5	190	0,432	0,617	0,540	0,165
Bet15	188-200	3	185	0,481	0,475	0,369	-0,008
Bet16	128-130	2	188	0,947	0,501	0,375	-0,308
Bex02	108-112	2	187	0,171	0,157	0,144	-0,037
Bex09	124-138	4	193	0,622	0,654	0,599	0,028
Bex22	128-150	3	193	0,591	0,616	0,535	0,014
Bex27	117-137	4	181	0,365	0,368	0,340	-0,015
Bex33	213-247	7	192	0,432	0,467	0,423	0,036
Bex37	185-207	5	173	0,434	0,482	0,424	0,041
Média	112-118	3,8	187,7	0,512	0,491	0,424	-0,016

A: número de alelos; N: número de indivíduos; H_e: esperada Heterozigosidade; H_o Heterozigosidade observada; PIC: conteúdo polimórfico informativo do loco; *F*: coeficiente de endogamia.

O polimorfismo encontrado para *B. excelsa* foi menor que de outras espécies Neotropicais, por exemplo, *Tabebuia aurea* com média de 36 alelos por loco (Medeiros, 2010); *Swietenia macrophylla,* média de 18,2 alelos por loco (Lemes et al., 2002), *Jacaranda copaia* média de 13,5 alelos por loco (Jones, 2003). Reis et al. (2009), observaram uma média de 10,4 alelos por loco para *B. excelsa*, também superior ao encontrado neste estudo. Sujii et al. (2015), em estudos de diversidade e

estrutura genética em cinco populações de *B. excelsa*, obtiveram médias que variaram entre 3,36 a 6,18 alelos por loco, o que corroboram aos encontrados neste estudo. O número total de alelos existente na população é um parâmetro importante da diversidade genética, a medida de riqueza alélica fornece subsídios para a escolha de quais populações devem ser priorizadas nos programas de manejo e conservação Caballero et al. (2010).

A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,171 (Bex02) a 0,947 (Bet16) com média de 0,512. A heterozigosidade esperada variou de 0,157 (Bex02) a 0,654 (Bex09) com média de 0,424 (Tabela 3). Sendo a média de heterozigosidade observada maior que a esperada. Reis et al. (2009) nos estudos com *B. excelsa* também encontrou heterozigosidade observada maior que a esperada. Sujii et al. (2015) estudando a estrutura e diversidade genética em cinco populações de *B. excelsa*, também relatou heterozigosidade observada maior que a esperada.

Alta taxa de heterozigosidade pode estar relacionada a mecanismos de auto-incompatibilidade da espécie, Cavalcante et al. (2008) relatou auto-incompatibilidade para *B. excelsa*. A auto-incompatibilidade contribui para a manutenção da diversidade genética dentro das populações, pois favorece a reprodução cruzada. Outros estudos com espécies arbóreas indicam possivel seleção a favor do heterozigoto em espécies auto-incompatíveis (Sebbenn et al., 2000; Ribas e Kageyama, 2004).

Ainda na Tabela 3, pode ser observado que o indice de fixação (*F*) que teve média de -0,016 indicando alta heterozigosidade e baixa endogamia na população de *B. excelsa* estudada. Segundo Azevedo, (2007), o valor do índice de fixação varia entre -1 e +1, valores positivos indicam excesso de homozigotos, e valores negativos excesso de heterozigotos. Zero é o valor encontrado para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quadro locos apresentaram índice de fixação (*F*) positivo (Bet14, Bex09, Bex22, Bex33), Os demais locos apresentaram valor de *F* negativo, sendo, portanto os que revelaram maior heterozigosidade observada na população em estudo (Tabela3). Para Kageyama et al. (2003), o índice de fixação é um dos parâmetros mais importantes em genética de populações, por medir o balanço entre homozigotos e heterozigotos.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,144 (Bex02) a 0,599 (Bex09) com média de 0,424 (Tabela 2.). De acordo com Botstein et al. (1980) valores de PIC abaixo de 0,25 são considerados pouco informativos, aqueles que revelam valores entre 0,25 e 0,50 são classificados como medianamente informativos e acima

de 0,50 altamente informativos. Sendo assim, o loco Bex02 é pouco informativo, não sendo recomendados em estudos posteriores para a espécie. Os locos Bet14, Bex09 e Bex22 são altamente informativos, pois apresentaram valores superiores a 0,50, os demais locos são considerados mediamente informativos. (Tabela 3).

4.2 Comparação da diversidade genética entre individuos adultos e juvenis de *B. excelsa*

O número total de alelos (A) da geração adulta foi 35, o número de alelos por loco variou de 2 (Bet16 e Bex02) a 5 (Bex33 e Bex37), com média de 3,5 alelos por loco. A geração juvenil apresentou no total de 38 alelos, o número de alelos por loco variou de 2 (Bet16 e Bex02) a 7(Bex33), com valor médio de 3,8 alelos por loco (Tabela 4). Observa-se que há um maior número de alelos na geração juvenil quando comparado com a geração de adultos, sugerindo fluxo gênico externo à área de estudo. Dardengo et al. (2016) também obteve maior número de alelos na geração juvenil que na adulta em estudos com populações de *Theobroma speciosum*.

A heterozigosidade esperada (H_e) variou entre 0,151 (Bex02) e 0,659 (Bex09) com média de 0,490 para os indivíduos adultos, para os juvenis variou de 0,169 (Bex02) a 0,639 (Bex09) com média de 0,493. A heterozigosidade observada (H_o) na geração adulta variou de 0,164 (Bex27) a 0,958 (Bet16) com média de 0,665, na geração juvenil variou de 0,185 (Bex02) a 0,928 (Bet16) com média de 0,502 (Tabela 4). Em ambas as gerações a média heterozigosidade observada foi maior que a esperada. A heterozigosidade observada foi elevada quando comparada a resultados de estudos com outras espécies arbóreas tropicais, *Theobroma speciosum* (Lemos, 2015), *Theobroma speciosum* (Dardengo et al., 2016) e *Psidium guineense* (Silva et al., 2016),

A média do índice de fixação foi negativa tanto para a geração adulta quanto para a ajuvenil, indicando alta taxa de heterozigotos na população estudada. Estudos de genética entre regenerantes e adultos de uma mesma população permite entender a dinâmica da manutenção da variabilidade entre gerações (Ciampi et al., 2000). A caracterização da variabilidade genética é fundamental para o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas, pois a manutenção desta variabilidade é a base para a conservação de espécies (Yeeh et al., 1996).

Tabela 4. Parâmetros de diversidade genética obtida a partir de 125 indivíduos adultos e 73 juvenis de *B. excelsa*

Locos	N	A	H_e	H_o	F
Adultos					
Bet12	118	3	0,585	0,669	-0,100
Bet14	118	5	0,634	0,475	0,130
Bet15	120	3	0,455	0,492	-0,043
Bet16	119	2	0,502	0,958	-0,314
Bex02	122	2	0,151	0,164	-0,035
Bex09	123	4	0,659	0,667	-0,001
Bex22	122	3	0,612	0,549	0,050
Bex27	119	3	0,349	0,353	-0,019
Bex33	122	5	0,472	0,443	0,029
Bex37	112	5	0,490	0,411	0,075
Média	119,5	3,5	0,490	0,665	-0,023
Juvenis					
Bet12	71	3	0,574	0,606	-0,041
Bet14	72	5	0,59	0,361	0,229
Bet15	65	3	0,503	0,462	0,040
Bet16	69	2	0,503	0,928	-0,300
Bex02	65	2	0,169	0,185	-0,041
Bex09	70	4	0,639	0,543	0,081
Bex22	71	3	0,625	0,662	-0,041
Bex27	62	4	0,405	0,387	-0,009
Bex33	70	7	0,460	0,414	0,047
Bex37	61	5	0,469	0,475	-0,078
Média	71	3	0,493	0,502	-0,011

N: número de indivíduos; A: número de alelos; H_e: Heterozigosidade esperada; H_o: Heterozigosidade observada; *F* coeficiente de endogamia.

Na geração de arvores adultas foram identificados 8 alelos raros de um total de 35 alelos, os juvenis apresentaram 7 alelos raros entre 38 alelos. Alelo raro é todo aquele cuja frequência é inferior a 5% (Azevedo, 2007). A presença de alelos raros nas populações naturais deve ser considerada nas estratégias de conservação dos recursos genético (Kalinowsk , 2004). Sendo identificado alelos raros na população, estratégias para a conservação *in situ* e ex *situ* deve ser desenvolvidas para garantir a manutenção da variabilidade genética da espécie (Guidugli, 2011). Desse modo a população de *B. excelsa* em estudo deve ser considerada em estratégias de conservação.

4.3 Determinação do fluxo gênico da população de *B. excelsa*

Nas análises de parentesco, foram atribuíram parentais para 77% dos indivíduos juvenis amostrados. Para 23% dos juvenis os pais estavam localizados fora da parcela experimental e não foram identificados, o que significa que a população não está isolada reprodutivamente.

53 indivíduos adultos participaram da polinização para gerar os juvenis. A distância média para o primeiro parental foi de 159 metros e para o segundo foi de 351 metros. Trinta e um indivíduos foram atribuídos como primeiro candidato a parental e 41 como segundo candidato. Um indivíduo adulto (141) foi atribuído com mais frequência como primeiro candidato a parental, com cinco eventos de atribuição, sendo, portanto o que mais contribuiu com descendentes para a próxima geração. O indivíduo 62 foi classificado com quatro eventos, quatro indivíduos foram atribuídos três vezes, oito indivíduos tiveram dois eventos de atribuição e os demais 17 indivíduos foram atribuídos apenas uma vez (Figura 7).

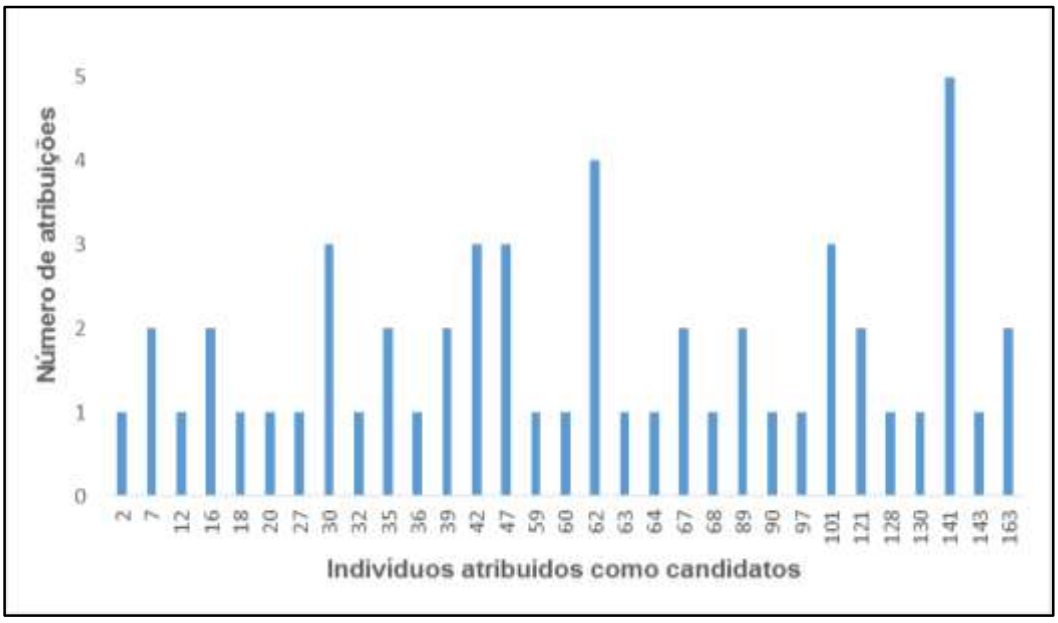

Figura 7. Distribuição de frequência dos primeiros candidatos a parentais atribuídos para os indivíduos juvenis. O eixo Y representa o número de atribuições e o eixo x representa os indivíduos atribuídos como candidatos.

Três indivíduos foram atribuídos com maior frequência como segundo candidato a parental com três eventos de atribuição cada um (Figura 8). Oito outros candidatos foram atribuídos duas vezes e os demais 30 indivíduos foram atribuídos apenas uma vez (Figura 8).

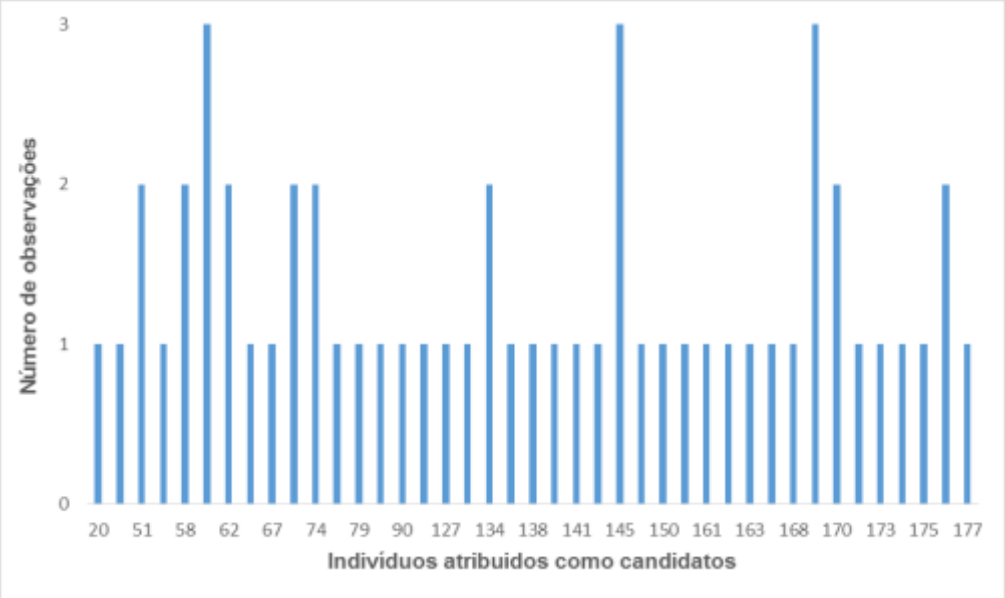

Figura 8. Distribuição de frequências dos segundos candidatos a parentais atribuídos para os indivíduos juvenis. O eixo Y representa o número de atribuições e o eixo x representa os indivíduos atribuídos como candidatos.

Não foram identificados juvenis oriundos de autofecundação, portanto as plantas que sobreviveram na floresta foram provenientes de fecundação cruzada. Cavalcante et al. (2012) em estudos de autopolinização manual de castanheira, observou que *B. excelsa* não produziu frutos com este tipo de polinização, e obteve baixa produção de frutos com pouco mais de 3% de frutos, quando os grãos de pólen foram transferidos entre as flores da mesma planta, corroborando com os resultados encontrados neste estudo, onde não foi encontrada árvores juvenis advindas de auto-fecundação.

Com base na distância entre os candidatos a parentais foi estimada a distância de dispersão de pólen, que variou de 13 a 1.119 metros, com média de 351 metros. As distâncias de polinização foram mais frequentes até 200 metros, no entanto, distâncias acima de 1000 metros também foram observadas (Figura 9).

Figura 9. Distribuição de frequência da dispersão de pólen de uma população de *B. Excelsa*

A estimativa da distância de dispersão de sementes variou de 11,4 a 412 metros, (figura 10) com média de 158 metros. Tuck Haugaasen et al. (2012) estudando a dispersão de sementes de *B. excelsa* por roedores, rastreou o destino de um grande número de sementes marcadas e expostas no chão florestal, observando que a maioria das sementes foram transportadas a distâncias de 15-30 m de sua posição original, distâncias inferiores as encontradas nesse estudo. Como na área estudada ocorre extrativismo do fruto da castanheira, a dispersão a distâncias maiores pode estar relacionada a interferência humana no local. Scoles e Gribel (2015), em estudos sobre regeneração de castanheiras, verificaram que os níveis de regeneração e adensamento de *B. excelsa* estão relacionados com algumas atividades humanas que pode facilitar a entrada de luz no sub-bosque e dispersar de forma involuntária sementes durante as diversas fases da coleta de castanha.

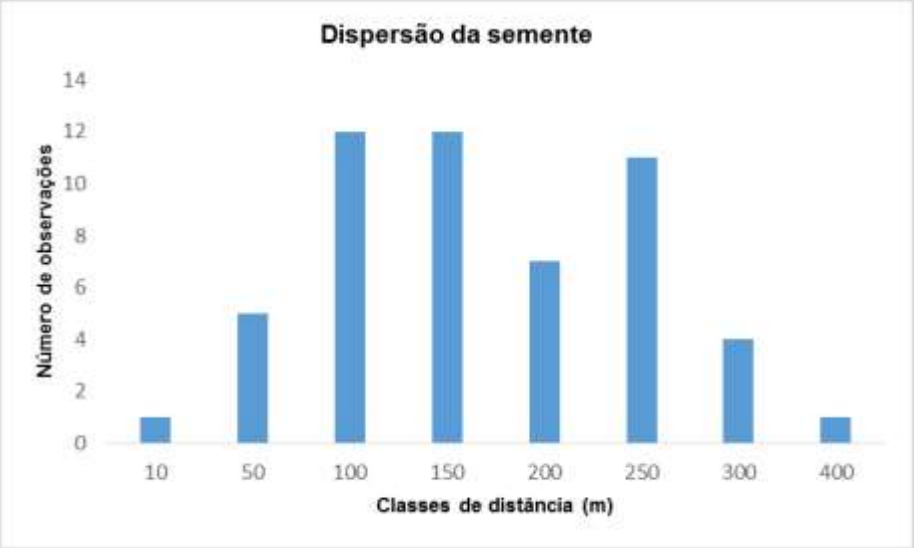

Figura 10. Distribuição de frequência da dispersão de sementes de uma população de *B. Excelsa*.

A análise de autocorrelação espacial demonstrou que existe correlação significativa para os indivíduos adultos e juvenis até aproximadamente 120 metros, apresentando um pico de coancestria positiva (θxy = 0,0013) aos 180 metros, sendo que os maiores valores de parentesco médio estão até 106 metros (Figura 11). De acordo com o correlograma, as sementes de *B. excelsa* são dispersas até aproximadamente 180 metros de distância da árvore matriz. Nesse tipo de estrutura genética espacial a grande possibilidade de ocorrerem cruzamentos entre indivíduos parentes, gerando endogamia biparental e consequentemente, depressão por endogamia, pois a espécie apresenta mecanismos de autoincompatibilidade.

Com base nos presentes resultados, pode-se inferir que a coleta de sementes de *B. excelsa* para fins de coservação não deve ser realizada em árvores localizadas dentro de distâncias inferiores a 180 m, a fim de evitar amostrar sementes de árvores parentes, o que reduziria o tamanho efetivo de variância (tamanho efetivo na população descendente). Contudo, mesmo utilizando esta estratégia, as sementes coletadas podem reter algum grau de endogamia biparental, se os cruzamentos ocorrerem dentro das vizinhanças das árvores maternas, conforme relata por Gusson et al. (2005).

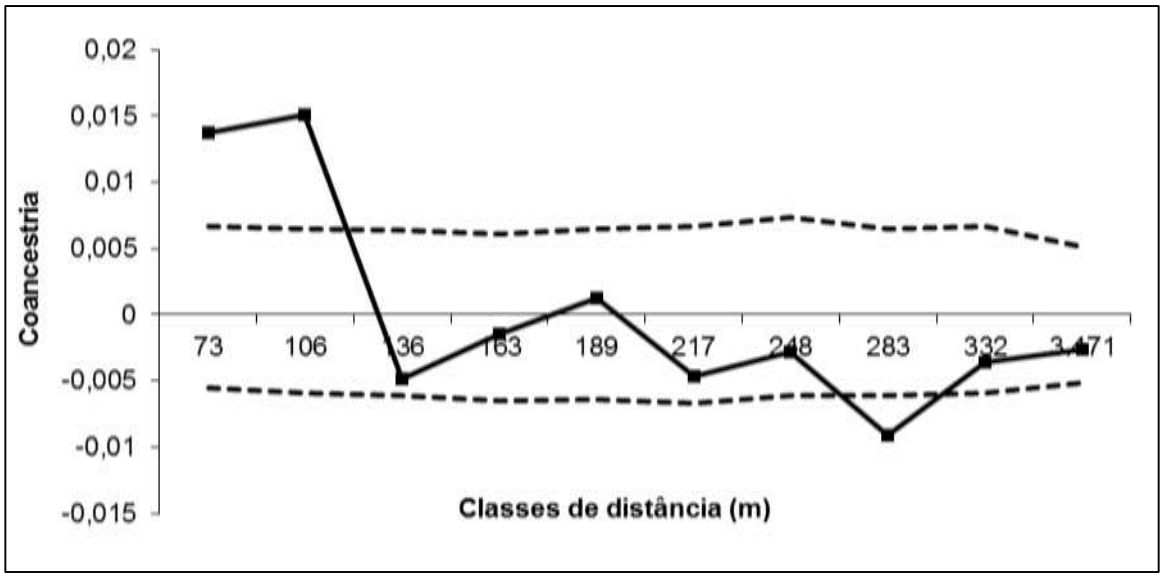

Figura 11. Correlograma plotando o coeficiente de coancestria em diferentes classes de distância entre indivíduos adultos e juvenis em uma população de B. *excelsa*. Linha pontilhada: intervalo de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente médio de coancestria estimado. Linha contínua: variação da coancestria.

4.4 Estrutura genética populacional

A estrutura populacional com base na análise Bayesiana realizada no programa STRUCTURE e, de acordo com o método ΔK descrito por Evanno et al. (2005), permitiu identificar dois grupos distintos na população de *B. excelsa* analisada. Para K=3, o valor de ΔK foi mais alto do que para os demais (Figura 12).

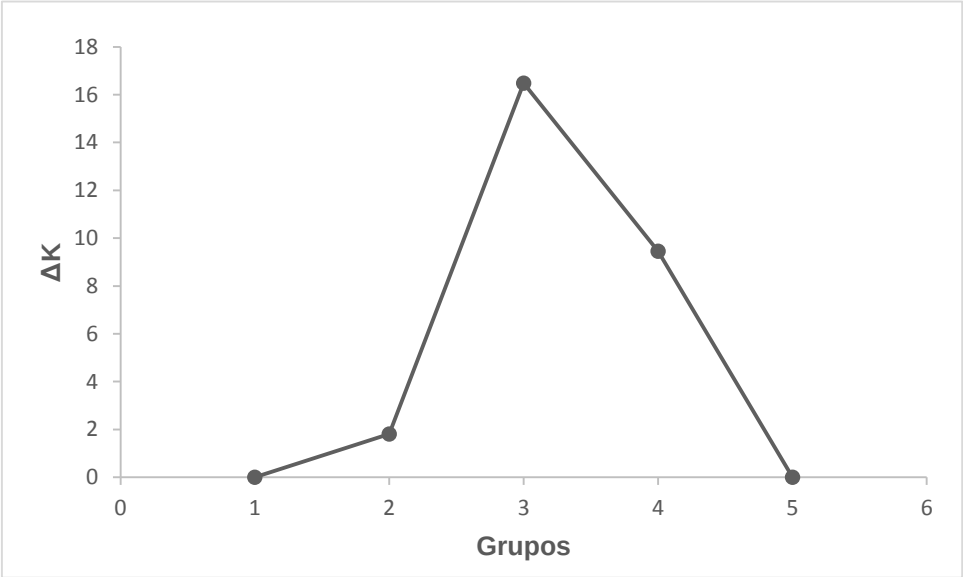

Figura 12. A. Representação gráfica do valor de ΔK para cada K (grupo) de acordo com as informações dos 10 locos SSR por meio do recurso Structure Harvester.

O grupo I reuniu 73 indivíduos, o grupo II 68 e o grupo II 57 (Figura 13 B). Os agrupamentos gerados pelo programa STRUCTURE não separou os indivíduos adultos dos juvenis (Figura 14 A), o que já era esperado, pois muitos dos parentais dos juvenis estão entre os indivíduos amostrados como adultos, logo alguns juvenis são mais idênticos geneticamente com alguns adultos do que com os outros juvenis.

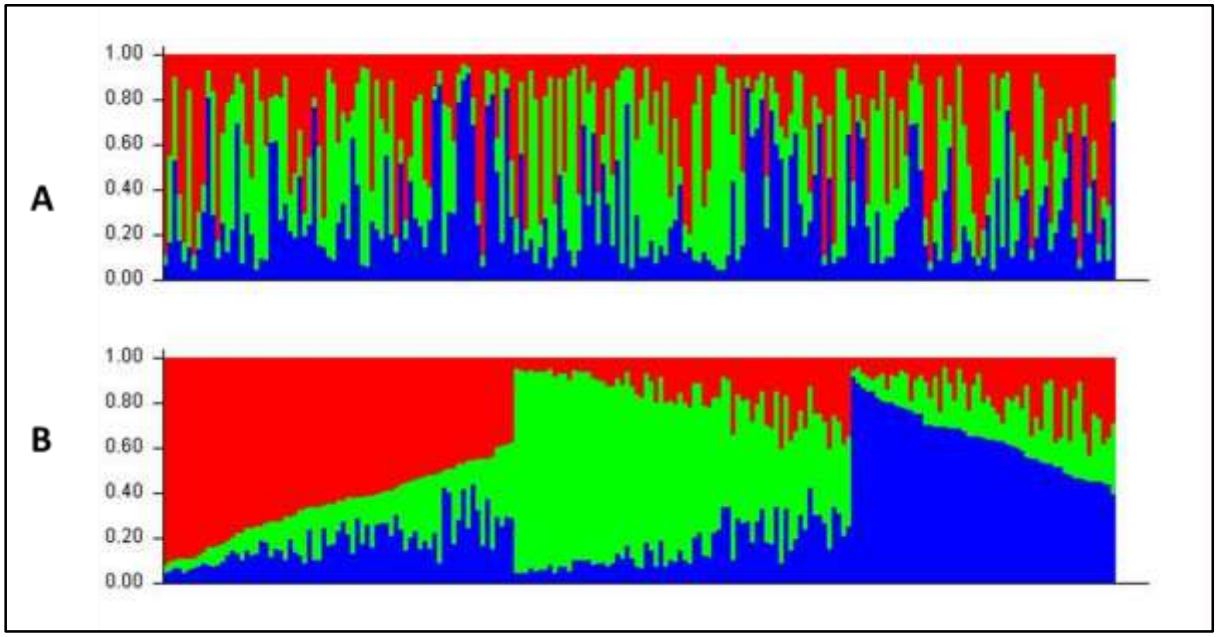

Figura 13. Representação dos 198 indivíduos da população natural de *B. excelsa,* Os indivíduos estão representados por barras verticais com coloração (vermelha ou verde) de acordo com o grupo genético ao qual pertencem.

A análise das coordenadas principais (Figura 11) indicou que os indivíduos estão separados em três grupos, confirmando os agrupamentos formados pelo programa STRUCTURE. A maior parte da variação entre indivíduos é explicada pela primeira coordenada principal (22,38%), que, em conjunto com a segunda coordenada principal, representam cerca de 29,89% da variação total.

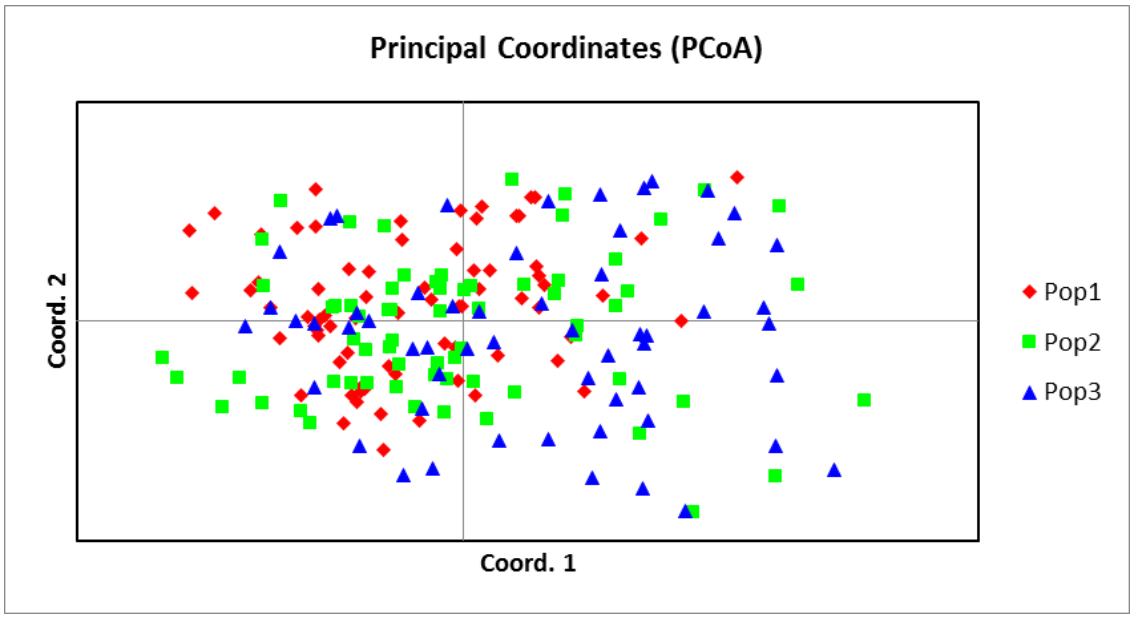

Figura 14. Relação genética entre 191 indivíduos de B. excelsa determinada pela Análise de Componentes Principais (PCoA). A Coordenada 01 explicou 11,19% e a coordenada 02 9,90% da variação dos dados.

A análise da variância molecular (AMOVA), a partir dos grupos formados pelo Structure, revelou que 98% da variabilidade encontra-se distribuída dentro dos grupos e 2% entre os grupos (Tabela 8). Costa et al. (2015) em estudos de estrutura genética de uma população de *Nectandra megapotamica* também encontrou maior diversidade dentro dos grupos (75.11%) que entre grupos (24,89%). Assim como Soares (2016), ao estudar a diversidade genética em uma população natural de *Hancornia speciosa*, observou maior variação genética dentro dos grupos (83,39%) do que entre os grupos (16,61%). Este padrão de estrutura genética está de acordo com o descrito na literatura que mostram que espécies arbóreas tropicais que se reproduzem por alogamia e mantêm a maior proporção de variabilidade genética dentro das populações (Zucchi et al., 2005).

Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA) de uma população natural de *B. excelsa* dividida em grupos segundo dados moleculares com dez locos SSR utilizando o programa "Structure"

Fonte de Variação	GL	SQ	CV	VT (%)	Valor de P
Entre grupos	2	20,194	0,056	2	<0,001
Dentro de grupos	393	1055,826	2,687	92	
Total	395	1076,020	2,743	100	

*Componente de Variância (CV), Variância Total (VT) e Probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso (P). As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

O valor de Fst para a população foi de 0,021. Fst é uma medida de diferenciação que mede a proporção da variância total das frequências alélicas que ocorre entre subpopulações, os efeitos da subdivisão da população e a redução da heterozigozidade de uma subpopulação devido à deriva genética. Valores de Fst menores 0,05 é indicativo de pouca diferenciação genética, e valores maiores que 0,5 indicativo de elevada diferenciação genética. O valor de Fst para a população indica pouca diferenciação genética entre os grupos, confirmando os resultados da AMOVA sugerindo um fluxo gênico eficaz entre os indivíduos da população de B. excelsa estudada. Zucchi et al. (2005) sugerem que a variação entre populações tem implicações diretas na conservação, indicando que um número maior de populações tem que ser amostrada quando o Fst é alto. Por outro lado, se o valor Fst for baixo, um maior número de indivíduos por população deve ser amostrado. Neste estudo, portanto, um grande número de individuos precisam ser mantidos in situ ou amostrados para conservação ex situ.

5. CONCLUSÃO

A população de *Bertholletia excelsa* estudada, apresenta diversidade genética, sendo a média da heterozigosidade observada maior do que a esperada. Os indivíduos adultos e juvenis apresentaram índice de fixação negativo, revelando assim uma alta heterozigosidade na população e ausência de endogamia. A ausência de endogamia na população sugere que a mesma não esta isolada reprodutivamente e que o fluxo gênico tem sido eficaz. A diversidade genética detectada encontra-se espacialmente estruturada dentro da população, sendo que quanto mais próximas às árvores, maior é a probabilidade de parentesco. Portanto, para a conservação da população recomenda-se que um grande número de indivíduos sejam mantidos *in situ* ou amostrados para a conservação *ex situ*.

6. REFERÊNCIAS

ALDRICH, P. R.; HAMRICK, J. L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. **Science**. 281: 103-105, 1998.

ANDERSON, J. A.; CHURCHILL, G. A.; AUTRIQUE, J.E.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**. 36: 181-186, 1993.

ARAÚJO, M. M; OSAQUI, H; MELO, R. **Padrão de distribuição espacial de castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K), barragem do contado, Floresta Nacional de Carajás, Pará.** In: Simpósio Latino – Americano Sobre Manejo Florestal, Santa Maria, RS. 2001 **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2001. P. 367-375.

ASHLEY, M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 29: 148-161, 2010.

AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**. 11: 665-669, 2010.

AZEVEDO, V. C**. Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. Brasília: Universidade de Brasília, 2007. 207p. (Tese-doutorado em Biologia Molecular).

BALLOUX, F.; MOULIN, N. L. The estimation of population differentiation with microsatellite marker. **Molecular Ecology**, Oxford. 11: 155-165, 2002.

BACLES, C.F.E.; ENNOS, R. A. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**. 101: 368–380, 2008.

BARLUENGA, M.; MEYER, A.; Phylogeography, colonization and population history of the Midas cichlid species complex (*Amphilophus* spp.) in the Nicaraguan crater lakes. **BMC Evolutionary Biology**. 10: 1-20, 2010.

BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**. 99: 580–591, 2007.

BOYLE, T. J. Criteria and indicators for the conservation of genetic diversity. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (ed). **Forest conservation genetics**: principles and practice. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p.239-251.

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

BUDKE, J. C.; GIEHL, E. L. H.; ATHAYDE, E. A.; ZÁCHIA, R. A. Distribuição espacial de *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay (Orchidaceae) em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. 18: 31-35, 2004.

CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programes. **Conservation Genetics**. 11: 409-419, 2010.

CAMARGO, P. B. D., et al. How old are large Brazil-nut trees (*Bertholletia excelsa*) in the Amazon **Scientia Agricola**, 51: 389-391, 1994.

CAMPOS, A. M., J. L. FREITAS, E. S. SANTOS & R. B. L. SILVA, Fenologia reprodutiva de *Bertholletia excelsa* Bonpl. em floresta de terra firme em Mazagão, Amapá. **Biota Amazônica** 3(1): 1-8, 2013.

CAVALCANTE, P. B. Frutos comestíveis da Amazônia. **Museu Paraense Emilio Goeldi**, Belém, 279 p., 1996.

CAVALCANTE, M. C. **Visitantes florais e polinização da Castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa) em cultivo na Amazônia Central.** UFC Universidade Federal do Ceará, 2008. 77p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia)

CAVALCANTE, M. C.; OLIVEIRA, F. F.; MAUÉS, M. M.; Freitas, B. M; Pollination requirements and the foraging behavior of potential pollinators of cultivated Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) trees in central Amazon rainforest. **Psyche: A Journal of Entomology**, 1-9, 2012

CAIXETA, T. E.; OLIVEIRA, A, C. B.; BRITO, G. B.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: Borém, A.; Caixeta, E. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, UFV, 2016. p.10-93.

CIAMPI, A .Y.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites para Copaifera Langsdorffii Desf. (Copaíba)-Leguminosae Caesalpinioideae e Otimização de Sistemas Fluorescentes de Genotipagem Multiloco. **Boletim de Pesquisa, Embrapa Cenargen**, Brasília, DF, 16:1-40, 2000.

CLAY, J. W. Brazil nuts: the use of a keystone species for conservation and development. In: FREESE, C. H. **Harvesting Wild Species - Implications for Biodiversity Conservation**. Baltimore: John Hopkins University Press. 1997. p. 246-282.

CLEMENT, C. R. Castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade amazônica:** exemplos e estratégias de utilização. Manaus: INPA, 2000. p. 119-132.

CORNEJO, F. **Historia natural de la castaña (*Bertholletia excelsa* Humb & B.) y propuestas para su manejo.** Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazônica (ACCA). Puerto Maldonado, Peru. 52p, 2003.

COSTA, L. S.; REINIGER, L. R. S.; Heinzmann, B. M.; AMARAL, L. P.; SERROTE, C. M. L. Study of the genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**. 14: 18407-18413, 2015.

DARDENGO, J. F. E.; ROSSI, A. A. B. R.; SILVA, B. M.; SILVA. I. V.; SILVA, C. J.; SEBBENN, A. M. Diversity and spatial genetic structure of a natural population of Theobroma speciosum (Malvaceae) in the Brazilian Amazon. **Biologia Tropical**. 64: 1091-1099, 2016.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 12: 13-15, 1987.

EPPERSON, B. K. Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. **New Forests** 6: 257-27, 1992.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14: 2611-2620, 2005.

FEARNSIDE, P. M. Desmatamento na Amazônia: Dinâmica, impactos e controle. **Acta Amazonica**. 36: 395-400, 2006.

FIGUEIRA, A. V. O.; CASCARDO, J. C. M. Marcadores moleculares no melhoramento. In: DIAS, L. A. S (ed). **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. p. 385-438.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.

GARCIA, C.; JORDANO, P.; GODOY, J. A. Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. **Molecular Ecology**. 16: 1947–1955, 2007.

GUIDUGLI, M. C. **Estudos Genéticos da Espécie Florestal Cariniana estrellensis (Raddi) Kuntez: Diversidade, Sistema de Cruzamento e Fluxo Gênico Contemporâneo.** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2011.169p. (Tese-doutorado em Ciências, Área de concentração: Genética).

GUIMARÃES. C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA JUNIOR, C. L. Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas. In: Borém, A.; Caixeta, E. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, UFV, 2016. p.129-177.

GUSSON E.; SEBBENN A. M.; KAGEYAMA P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess) Miers. **Scientia Forestalis**, 66:123-135, 2005.

HAMRICK, J. L.; SCHNABEL, A. Understanding the genetic structure of plant populations: some old problems and a new approach. In GREGORIUS, H.R.(Ed). **Population genetics in forestry:** lecture notes in biomathermatics. Berlin: Spring-Verlag, 1985. p.50-70.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology***,* 21: 618-620, 2002.

JACOB, H.J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.P.; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, 67:213-224, 1991.

JORDANO, P. Pollen, sees and genes: the movement ecology of plants. **Heredity,** 105: 329-330, 2010.

JONES, F. A.; HUBBELL, S. P. Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical tree Jacaranda copaia (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, 3: 403-405, 2003.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Florestalis**. 64: 93-107, 2003.

KALINOWSKI, S.T. Coutuing alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, 5: 5339-543, 2004.

LEÃO, N. V. M. & J. O. P. CARVALHO. Fenologia reprodutiva de 25 espécies arbóreas da Amazônia. In: SILVA, J. N. M.; CARVALHO, J. O. P.; YARED, J. A. G. **A silvicultura na Amazônia Oriental**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. p. 117-128.

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

LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, Swietenia macrophylla King (Meliaceae), a threatened Neotropical timber species. **Journal of Heredity**, 4: 287-290, 2002.

LIMA, S. M. S., WADT, L. O; SILVA, L. M; AZEVEDO, V. R; MAUÉS, M. M. Biologia Reprodutiva de Castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl) em um Plantio no Acre. In: III Congresso Latino-Americano de Ecologia, São Lourenço, MG. 2009 **Anais...** São Lourenço: SEB, 2009. P.1-9.

LIU, K.; MUSE, S. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, 21: 2128-2129, 2005.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil.** 2ª Ed. São Paulo: Nova Odessa. 2002.

MACHADO, F.R.B.; VINSON, C.C.; SILVA, V.P.; CIAMPI, A.Y. Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais. Anais 53º Congresso Nacional de Botânica, 22 a 26 de Julho, 2002. Recife, PE.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; VENCOVSKY, R.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic structure based on nuclear and chloroplast microsatellite loci of *Solanum iycocarpum* A. St. Hil. (*Solanaceae*) in Central Brazil. **Genetics and molecular research**. 10: 665–77, 2011.

MAUÉS, M.M. Reproductive phenology and pollination of the brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. In: KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (ed.). **Pollinating Bees – The conservation Link Between Agriculture and Nature**. Ministry of Environment, Brasília, DF, 2002. 313p.

MEDEIROS, A. B. **Fluxo de Pólen e Estrutura Genética Espacial em UMA população de Tabebuia aurea (*Bignoniaceae*) na Estação Ecológica de Águas Emedadas, DF.** (Tese - doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília, DF. 2010.

MILLACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R., (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998.

MORI, S. A. The Brazil nut industry - Past, present and future. In: PLOTKIN, M.; FAMOLARE, L. (ed.). **Sustainable harvesting and marketing of rainforest products**, Island Press, Washington. 1992. p. 241–251.

MORI, S.A.; PRANCE, G.T. **Lecythidaceae-Part II: The zygomorphic-flowered New World genera (*Couroupita, Corythophora, Bertholletia, Couratari, Eschweilera, & Lecythis*), with a study of secondary xylem of Neotropical Lecythidaceae**. New York Botanical Garden, New York, 1990. 366p. (Monografia - Curso de Ciências Biológicas).

MORITZ, A. **Estudos biológicos da floração e da frutificação da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. (Embrapa-CPATU. Documentos, 29). 82p. 1984.

MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005. 165p. (Tese - Doutorado em Ciências Florestais).

MÜLLER, C. H.; FIGUEIRÊDO, F.J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U.; STEIN, R.L.B.; SILVA, A. B. **A cultura da castanha-do-brasil. Brasília**: Embrapa/SPI. Embrapa - SPI. (Coleção Plantar, 23). 1995. 65p.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via Polymerase catalysed chain reactin. **Methods Enzymol**, 55: 335-350, 1987.

NAMKOONG, G.; BOYLE, T.; EL-KASSABY, Y. A.; PALMBERG-LERCHE, C.; ERIKSSON, G.; GREGORIUS, H. R.; e YOUNG, A. **Criteria and indicators sustainable forest management: assessment and monitoring of genetic variation.** Roma: FAO, 2002 p. 46.

NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, 88: 264-276, 1997.

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

NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Ecology Systematics**. 28:105-128, 1997.

NEIGEL, J. E. Is FST obsolete? Conservation Genetics. 3: 167–173, 2002.

ORTIZ, E. G. Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). In: SHANLEY, P.; PIERCE, A. R.; LAIRD, A. R.; GUILLEN, A. (ed.). **Tapping the green market:** certification & management of non-timber forest products. Earthsan Publications, Londres, Reino Unido, 2002. p. 61-74.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**. 87: 551-568, 1999.

PRASANTH, V. P.; CHANDRA, S.; JAYASHREE, B.; HOISINGTON, D. AlleloBin - A program for allele binning of microsatellite markers based on the the algorithm of Idury and Cardon (1997). **Genome Research**, 7:1104-1109, 2006.

PEREIRA, M. G.; RAMOS, H. C.C.; PEREIRA T. N. S.; BATISTA, F. R. C. Marcadores Moleculares no pré-Melhoramento In: Borém, A.; Caixeta, E. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, UFV, 2016. p.95-128.

PERES, C.; BAIDER, C. Seed dispersal, spatial distribution and population structure of Brasil nut (*Bertholletia excelsa*) in southeastern Amazonia. **Journal of Tropical Ecology.** 13: 69-79, 1997.

PETIT, R. J.; MOUSADIK, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**. Gainesville, 4: 844-855, 1998.

PRITCHARD, J; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data.**Genetics**, 155: 945–959, 2000.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for structure software: Version 2.1**. Disponível em: http://pritch.bsd.uchicago.edu., 2004. Acesso em: 24 de 10 de 2016.

RAJORA, O. P. RAHMAN, M. H.; BUCHERT, G. P; DANCIK, B. P. Microssatellite DNA analysis of genetic effectis of havesting in old-grouth eastern white pine (*Pines strobus*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, 9: 339-348, 2000.

REIS, A. M.; BRAGA, A. C., LEMES, M. R., GRIBEL, R.; COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree Bertholletia excelsa Humb. & B. Lecythidaceae). **Molecular Ecology Resources**. 9: 920-923, 2009.

RIBAS, L. A.; KAGEYAMA, P. Y.; Estrutura genética em uma população de Trema micrantha (L.) B. considerando diferentes estádios de vida. **Scientia Forestalis**. 65:176-187, 2004.

SALOMÃO, R. P. Densidade, estrutura e distribuição espacial da castanheira-do-brasil (Bertholletia excelsa H. & B.) em uma floresta tropical de platô na Amazônia Setentrional. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais**. 4: 11-25, 2009.

SALOMÃO, R. P. Estrutura e densidade de *Bertholletia excelsa* H. & B. ("Castanheira") nas regiões de Carajás e Marabá, estado do Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais**. 7: 47-68, 1991.

SALOMÃO, R. P.; ROSA, N. A.; NEPSTAD, D. C.; BAKK, A. Estrutura populacional e breve caracterização ecológica – econômica de 108 espécies arbóreas da floresta amazônica brasileira. **Interciência**. 20: 20-29, 1995.

SEMAGN, K.; BJORNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. **African Journal of Biotechnology**, 25: 2569-2587, 2006.

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

SEBBENN, A. M; KAGEYAMA, P.Y, Siqueira A. C. M. F and Zanatto A. C. E. Taxa de cruzamento em populações de Cariniana legalis (Mart.) O. Ktze.: Implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, 58: 25-40, 2000.

SCOLES, R. **Ecologia e extrativismo da castanheira (***Bertholletia excelsa***, Lecythidaceae) em duas regiões da Amazônia Brasileira**. 2010. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

SCOLES, R.; GRIBEL, R.; Human Influence on the Regeneration of the Brazil Nut Tree (*Bertholletia excelsa* Bonpl., Lecythidaceae) at Capanã Grande Lake, Manicoré, Amazonas, Brazil. **Human Ecology**, 43: 843-854, 2015.

SLATE, Jon; MARSHALL, Tristan; PEMBERTON, Josephine. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. **Molecular Ecology**, 9: 801-808, 2000.

SOUZA, I. F.de. **Cadeia produtiva de Castanha-do-brasil**. Campo Grande. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2006. 152p. (Dissertação de Mestrado em Agronegócios).

SHEPARD, JR. G. H.; RAMIREZ, H. "Made in Brazil": Human Dispersal of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in Ancient Amazonia. **Economic Botany**, 25: 44-65, 2011.

SLATKIN, M. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. **Science**. 236: 787-792, 1987.

SUJII, P.S; CIAMPI A.Y.; SOLFERINI V. N, AZEVEDO V. C. R.; Isolation and characterization of microsatellite markers for *Bertholletia excelsa* (*Lecythidaceae*) population genetics analysis. **Genetics and Molecular Research**, 12(4): 5278-5282. 2013.

SUJII, P.S; MARTINS, K.; WADT, L. H. O.; AZEVEDO, V. C. R. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. **Conserv Genet**. 16: 955-964, 2015.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. Theuse of microsatellites for genetic analysis of natural populations-acritical review. In: DeSalle R and Schierwater B (eds) Molecular Approaches to Ecology and Evolution. 12: 71-86, 1998.

TONINI, H.; LOPES, C. E. V.; BORGES, R. A.; KAMINSKI, P. E.; ALVES, M. S.; FAGUNDES, P. R. O. Fenologia, estrutura e produção de sementes em castanhais nativos de Roraima e características socioeconômicas dos extrativistas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais**. 9: 399-414, 2014.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**. 10: 967-981, 2000.

TUCK HAUGAASEN, J. M.; HAUGAASEN, T.; PERES, C. A., GRIBEL, R.: WEGGE, P. Fruit removal and natural seed dispersal of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in Central Amazonia, Brazil. **Biotropica**, 44: 205-210, 2012.

VARELLA, T. **Estrutura populacional, diversidade genética e aspectos reprodutivos da espécie*Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng**. UNEMAT: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014. 98p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant population. **Molecular Ecology**, 13: 921-935, 2004.

VIEIRA, F. S. **Diversidade Genética e Estrutura Populacional de Populações Naturais de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* B.)**. UNEMAT: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014. 82p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

VILHENA, M. R. **Ciência, tecnologia e desenvolvimento na economia da castanha-do-brasil:** A transformação industrial da castanha-do-brasil na COMARU-Região Sul do Amapá. Unicamp: Universidade Estadual de Campinas, 2004. 120p. (Dissertação – mestrado em Tecnologia de Alimentos).

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

WADT, L. H.; KAINER, K. A. Domesticação e melhoramento de castanheira. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (ed.). **Domesticação e Melhoramento - Espécies Amazônicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2009. p. 297-318.

WEBER, Z.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Annual Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388396, 1989.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Genetics data Analysis II – Methods for discrete population genetc data**.** Sunderland: Sinauer Assoc. **Inc., Sunderland, MA, USA**, 1996.

WITKOSKI, A. C. Florestas de trabalho: os camponeses amazônicos de várzea e as formas de uso de seus recursos naturais**.** In: II Encontro da Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade, Indaiatuba, SP. 2004 **Anais...** Indaiatuba: ANPPAS, 2004. p. 30.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores moleculares RAPD e SSR.** ESALQ: Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2002. 130p. (Tese – Doutorado em Agronomia).

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; COUTO, M. A., MORAIS, L. K. D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow of Eugenia dysenterica natural populations. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 40(10): 975-980, 2005.

ZUIDEMA, P. A. **Ecología y manejo del árbol de castaña (*Bertholletia excelsa*)**. Programa Manejo de Bosques de la Amazonía Boliviana, PROMAB, **Scientific Series**, 2003. 111p.

ZUIDEMA, P. A.; BOOT, RENÉ, G. A. Demography of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in the Bolivian Amazon: impact of seed extraction on recruitment and population dynamics. **Journal of Tropical Ecology**. 18: 1-31, 2002.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T. **POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31**. Edmonton: University of Alberta, 1999.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**.11: 413-418, 2001.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology***,* v. 21, p. 618-620, 2002.