

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE
Anacardium humile St. Hill USANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES

Josimar Morais de Souza

Biólogo

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Setembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE
Anacardium humile St. Hill USANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES

Josimar Morais de Souza

Orientador: Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis

Co-orientadora: Prof. Dra. Mariana Pires de Campos Telles

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás – UFG, Regional Jataí, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Setembro de 2014

Souza, Josimar Morais de Souza.

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Anacardium humile* St. Hill USANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES [manuscrito] / Josimar Morais de Souza Souza. - 2014.

iv, 54 f.: il.

Orientador: Dr. Edésio Fialho dos Reis;

Co-orientadora: Dr^a. Mariana Pires de Campos Telles.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Jataí, 2014.

Bibliografia. Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas.

1. Cerrado. 2. Marcador molecular. 3. Pré melhoramento. 4. Variabilidade genética. I. Reis, Edésio Fialho dos Reis, orient. II. Telles, Mariana Pires de Campos Telles, co-orient. III. Título.

JOSIMAR MORAIS DE SOUZA

TÍTULO: "Diversidade genética em acessos de *Anacardium humile* St. Hill usando marcadores microssatélites".

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 03 de outubro de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



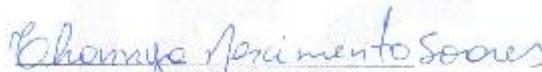
Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis
Presidente – CAJ/UFG



Prof.ª Dra. Mariana Pires de Campos Telles
Membro Externo – ICB/UFG



Prof. Dr. Iderval da Silva Júnior Sobrinho
Membro Externo- CAJ/UFG



Prof.ª Dra. Thanyá Nascimento Soares
Membro Externo – ICB/UFG

Jarai - Goiás
Brasil

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOSIMAR MORAIS DE SOUZA – Filho de Oraldo Simão de Moraes e Judite de Souza Azevedo Nascido em Jataí, Goiás, cidade onde concluiu as séries iniciais no Colégio Estadual Frei Domingos e ensino fundamental e médio no Colégio Estadual Nestório Ribeiro em 2005. Em março de 2006 ingressou na Universidade Federal de Goiás – UFG, Regional Jataí graduando-se em Ciências Biológicas modalidade Licenciatura em março de 2010. Em agosto de 2012 entrou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) na mesma instituição da graduação.

“A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência”

Charles Darwin

Ao meu pai Adejalba e Mãe Judite.

As minhas irmãs Josiane, Leidiane e Reigiane.

Ao meu amor Nayra Thaís.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás (UFG) e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela qualidade do ensino, estrutura oferecida e oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

Em especial:

Ao meu orientador e amigo, professor Doutor Edésio Fialho dos Reis pela companhia no dia a dia, pelos ricos ensinamentos, por acompanhar cada etapa dessa dissertação, por incentivar o meu crescimento profissional.

À Dra. Mariana Pires de Campos Telles pelo suporte, amizade, coorientação e confiança.

Às pessoas que mais amo, minha família: meus pais querido Judite e Adejalba pelo apoio sincero e amor incondicional. E as minhas irmãs queridas, Josiane, Leidiane e Reigiane.

A minha companheira de todas as horas, Nayra Thaís, pela paciência e companheirismo. Obrigado por sempre estar ao meu lado, independente de minhas decisões.

Ao meu amigo e colega de laboratório Jefferson, pessoa com quem eu passo a maior parte do dia, obrigado por me aguentar e por fazer meus dias de trabalho mais divertidos.

À Eliane pela amizade e auxílio em inúmeras etapas do meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio): Daniela, Ellen, Leciane, Ramilla, Sara e Wanessa, pelo aprendizado mútuo e convívio agradável.

Aos colegas e professores com quem compartilhei esse período, por terem me proporcionado tantos momentos de aprendizagem.

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
1. INTRODUÇÃO	5
2.1 Objetivos Gerais	8
2.2 Objetivos específicos	8
3 REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1 O Bioma Cerrado	9
3.2 Biodiversidade vegetal e bancos de germoplasma	10
3.3 Considerações gerais sobre o cajuzinho do cerrado	11
3.4 Caracterizações e uso de recursos genéticos do Cerrado	13
3.5 O uso de marcadores moleculares no estudo de espécies nativas do Cerrado	16
3.6 Fluxo gênico em plantas	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Coleta de material vegetal e extração de DNA	21
4.2 Análises estatísticas	25
4.2.1 Avaliação dos locos	25
4.2.2 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg	25
4.2.3 Desequilíbrio genotípico entre pares de locos	25
4.2.4 Variabilidade genética intrapopulacional	26
4.2.5 Tamanho efetivo	26
4.2.6 Variabilidade interpopulacional e estrutura genética populacional	27
4.2.7 Fluxo gênico	29
4.2.8 Análise de agrupamento	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Caracterização da Diversidade Genética	31
5.1.1 Diversidade dos Locos	31
5.1.2 Variação entre e dentro das populações	36
5.1.3 Estrutura genética	38
5.1.4 Fluxo gênico	40

5.1.5 Distância genética.....	41
6 CONCLUSÃO	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
8 REFERÊNCIAS.....	48

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Anacardium humile* A. St.-Hil USANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO – O cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile* St. Hill) é uma espécie subarbustiva de ampla distribuição no Cerrado que está sujeita aos efeitos deletérios da fragmentação deste bioma. Neste trabalho, foram estudados 333 genótipos de 14 populações preservados na Coleção de germoplasma da UFG Regional Jataí com base em nove locos microssatélites, com o objetivo de analisar a diversidade e estrutura populacional e testar as causas da diferenciação das populações. *Anacardium humile* A. St. Hil possui alta diversidade genética em todas as populações com 185 alelos encontrados, uma média de 20,55 alelos por loco. As populações apresentaram uma média geral de 85,3 alelos por população revelando um elevado conteúdo informativo associado aos marcadores microssatélites. Os valores médios de heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) encontrados para os locos foram de 0,876 e 0,656 respectivamente. O coeficiente de endogamia dentro das populações variou de -0,016 a 0,310, com uma média de 0,169, indicando que as frequências alélicas não estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A análise da estruturação genética a partir do dendograma gerado pela matriz de distância genética permitiu a formação de 7 grupos, evidenciando a divergência genética dos genótipos. A divergência genética entre populações foi relativamente baixa (9,6%). Os valores de fluxo gênico encontrados indicam que a estrutura metapopulacional de *A. humile* St. Hill ainda não está comprometida. A correlação entre a matriz de distância genética com a matriz de distância geográfica e se mostrou ineficiente para a divergência encontrada entre as populações.

Palavras-chave: Cerrado; Marcador molecular; Pré-melhoramento; Variabilidade genética.

GENETIC DIVERSITY IN THE ACCESS *Anacardium humile* A. St.-Hil USING MARKERS MICROSATELLITE

ABSTRACT - The cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile* St. Hill) is widely distributed species undergrowth in the Cerrado which is subject to the deleterious effects of fragmentation of this biome. In this work, we studied 333 genotypes of 14 people population preserved in the germplasm collection of UFG Regional Jataí on nine microsatellite loci, in order to analyze the diversity and population structure and test the causes of differentiation of populations. *Anacardium humile* A. St. Hill has a high genetic diversity in all populations with 185 alleles found, an average of 20.55 per locus. The populations showed an overall average of 85.3 alleles per population revealing a high information content associated with microsatellite markers. The expected average values of heterozygosity (H_e) and observed (H_o) loci were found to 0.876 and 0.656 respectively. The coefficient of inbreeding within the population ranged from -0.016 to 0.310 with an average of 0.169, indicating that allelic frequencies are not following proportion expected for the Hardy-Weinberg equilibrium. The analysis of the genetic structure of the dendrogram generated from the matrix of genetic distances allowed the formation of groups 7, showing the genetic diversity of genotypes. The genetic divergence between populations was relatively low (9.6%). The gene flow values found indicate that the metapopulation structure of *A. humile* St. Hill is not yet committed. The correlation between genetic distance matrix with and geographic distance matrix proved inefficient in the divergence found among populations.

Keywords: Cerrado; Molecular marker; Pre-breeding; Genetic variability

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional (IBGE, 2014; Ribeiro e Walter, 1998). Considerado como um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (Myers et al., 2000), apresenta extrema abundância de espécies endêmicas e vem sofrendo uma excepcional perda de habitat (Primack e Rodrigues, 2001). Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 600 espécies de plantas nativas já catalogadas (Machado et al., 2004). Existe uma grande diversidade de habitats, que determinam uma notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias (Ribeiro e Walter, 1998).

Além dos aspectos ambientais, o Cerrado tem grande importância social (Bizerril, 2003). Muitas populações sobrevivem de seus recursos naturais, incluindo etnias indígenas, geraizeiros, ribeirinhos, babaçueiras, vazanteiros e comunidades quilombolas que, juntas, fazem parte do patrimônio histórico e cultural brasileiro, e detêm um conhecimento tradicional de sua biodiversidade. Mais de 10 tipos de frutos comestíveis são regularmente consumidos pela população local e vendidos nos centros urbanos, como os frutos do Pequi (*Caryocar brasiliense*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), Mangaba (*Hancornia speciosa*), Cagaita (*Eugenia dysenterica*), Bacupari (*Salacia crassifolia*), Cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile* St. Hill), Araticum (*Annona crassifolia*) e as sementes do Barú (*Dipteryx alata*) (MMM, 2007).

Um grande número de espécies de plantas e animais do Cerrado correm riscos de extinção. Estima-se que 20% das espécies nativas e endêmicas já não ocorram em áreas protegidas e que pelo menos 137 espécies de animais que ocorrem no Cerrado estão ameaçadas de extinção (MMA, 2007). Depois da Mata Atlântica, o Cerrado é o bioma brasileiro que mais sofreu alterações com a ocupação humana. (Machado, 2004). Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente a crescente pressão para a abertura de novas áreas, visando incrementar a produção de carne e grãos para exportação, tem levado a um progressivo esgotamento dos recursos naturais da região.

O Brasil se destaca por ser um dos principais centros de diversidade genética de fruteiras silvestres do mundo, entretanto, muito pouco se conhece sobre a diversidade genética da grande maioria destas espécies (Franzon, 2008). Dentre elas cabe citar as plantas da família Anacardiaceae, a qual é representada por aproximadamente 80 gêneros e 600 espécies (Barroso et al., 2002). Dentro desta família assume especial importância *Anacardium humile* St. Hill (Figura 01), popularmente conhecido como cajuzinho do cerrado, sendo que seu fruto e pseudo fruto possuem grande importância alimentar, industrial, medicinal e econômica. Da amêndoa, rica em proteínas, calorias, lipídios, carboidratos, fósforo e ferro, é extraído um óleo comestível, que pode ser utilizado em substituição ao azeite de oliva (Almeida et al., 1998). Além de ser uma espécie pouco estudada e não domesticada, o cajuzinho do cerrado vem sofrendo com o extrativismo predatório (Silva et al., 2001).



Figura 01: *Anacardium humile* St. Hill.

Apesar de sua importância, pouco se conhece sobre a diversidade genética dessa espécie, conhecimento esse que segundo Oliveira et al., 2007 poderia contribuir para a conservação da mesma, bem com orientar programas de melhoramento genético. O conhecimento da variabilidade genética de uma coleção está intimamente relacionado à sua caracterização. A caracterização é uma atividade prioritária na estratégia de abordagem e manejo de coleções e bancos de germoplasma, pois consiste em tomar dados para descrever, identificar e diferenciar os acessos (Valls, 2007).

Os estudos sobre diversidade genética em coleções podem ser realizados a partir de caracteres morfológicos de natureza qualitativa ou quantitativa (Moreira et al., 1994). De acordo com Shimoya et al. (2002), a avaliação da divergência genética é efetuada por diversos métodos que levem em consideração as características agronômicas, fisiológicas, genéticas e morfológicas.

A caracterização molecular é realizada com vários objetivos, dentre eles têm-se a quantificação da diversidade e a determinação da estruturação genética da população, sendo que essa caracterização apresenta a vantagem de detectarem o polimorfismo ao nível do genótipo, sendo assim independente dos efeitos ambientais e o estágio fisiológico da planta (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Para a caracterização da diversidade, há vários marcadores moleculares disponíveis, sendo o mais utilizado os microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*), pelo seu elevado conteúdo informativo, sua robustez analítica e transferibilidade, o qual tem sido utilizado com sucesso na caracterização de coleções (Conte et al., 2006).

Essa caracterização torna-se importante e essencial para o início do desenvolvimento dos trabalhos de melhoramento genético com essa espécie, uma vez que a variabilidade genética é a matéria prima para o melhoramento. Além disso, com esta caracterização pode-se conhecer um pouco mais a biologia desta espécie e buscar melhor orientação para sua preservação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Descrever e comparar a diversidade genética em quatorze populações de *Anacardium humile* St. Hill, constituintes da Coleção da UFG Regional Jataí, baseado em um conjunto de locos microssatélites.

2.2 Objetivos específicos

1. Estimar a magnitude e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações;
2. Avaliar, de maneira indireta, o fluxo gênico entre as populações;
3. Estimar a divergência genética entre as populações;
4. Verificar se a variabilidade genética está estruturada espacialmente.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O Bioma Cerrado

O Brasil se destaca no cenário mundial como um dos maiores detentores em biodiversidades do planeta, é considerado um dos países com maior perspectiva para a sua exploração econômica, assim como o Cerrado, o segundo maior bioma do país, com elevado grau de endemismo, que abriga a mais rica flora dentre as savanas do mundo e detém cerca de 5% da biodiversidade do planeta (MMA, 2007), abrigando mais de 6.000 espécies de plantas (podendo este número chegar a 10.000) (Klink e Machado, 2005).

O Cerrado é um domínio fitogeográfico do tipo savana que ocorre no Brasil, em partes do Paraguai e da Bolívia. No Brasil, localiza-se principalmente no Planalto Central, ocupando 24% do território nacional, pouco mais de 2 milhões de Km², abrangendo os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Tocantins, Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Piauí e o Distrito Federal (Rodrigues e Carvalho, 2001).

A vegetação, em sua maior parte, é rasteira, constituída principalmente por gramíneas, coexistindo com arbustos e árvores esparsas, baixos, tortuosos, de casca grossa, folhas largas e sistema radicular profundo, que permite a absorção da água disponível nos solos abaixo de 2 metros de profundidade, mesmo durante a estação seca (Rodrigues e Carvalho, 2001). Toda essa abundância de espécies do Cerrado está associada à diversidade de ambientes. No Cerrado a heterogeneidade espacial (a variação dos ecossistemas ao longo do espaço) seria um fator determinante para a ocorrência de um variado número de espécies (Machado et al., 2004).

No entanto, apesar de toda essa riqueza biológica, o Cerrado vem sofrendo intensa degradação (Klink e Machado, 2005). Assim como a Amazônia, o Cerrado é um patrimônio ameaçado pela fragmentação (Nepstad et al., 2008). O modelo econômico de exploração tem tradicionalmente evidenciado a produção pecuária e/ou a conversão da terra para agricultura, e tem negligenciado o valor dos produtos florestais não madeireiros (MMM, 2007). Segundo o Ministério do Meio Ambiente houve um aumento considerável no processo de ocupação do Cerrado, principalmente a partir dos anos 1970, com o desenvolvimento de técnicas e tecnologias agrícolas,

especialmente quanto à adubação do solo e ao surgimento de novas variedades de *commodities* mais adaptadas à região.

No Brasil, estudos sobre a fragmentação de habitat têm sido desenvolvidos desde a década de 70 (Willis, 1979), com ênfase em ecossistemas tipicamente florestais, como a Amazônia e a Mata Atlântica (Piratelli et al., 2008). Talvez por sua natureza não florestal, os estudos de fragmentação no Cerrado são mais escassos, embora o bioma tenha sido em termos absolutos, o que mais perdeu área para as atividades antrópicas (Machado et al., 2004).

Nas últimas décadas as transformações ocorridas no Cerrado trouxeram grandes danos ambientais, como fragmentação de habitats, redução da biodiversidade, invasão de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos, degradação de ecossistemas (Klink e Machado, 2005).

Ainda que considerado um dos biomas mais ricos em biodiversidade, o Cerrado brasileiro é um dos mais ameaçados do mundo (MMA, 2007). Tanto que em Myers et al. (2000) cita o mesmo como um dos *hotspot* mundiais para a conservação da biodiversidade, ou seja, a excepcional concentração de espécies endêmicas no Cerrado esta perdendo seu habitat.

A situação do Cerrado é preocupante, segundo estimativas de Machado et. al. (2004), mesmo os recentes esforços do Ministério do Meio Ambiente - MMA de identificar áreas prioritárias para a conservação e iniciar um processo de organização do conhecimento sobre a biodiversidade do bioma não têm sido capazes de conter a atual tendência ao desaparecimento do mesmo. Ainda segundo Machado o bioma deverá ser totalmente destruído no ano de 2030, caso as tendências de ocupação continuem causando uma perda anual de 2,2 milhões de hectares de áreas nativas.

3.2 Biodiversidade vegetal e bancos de germoplasma

A identificação e correta caracterização da diversidade genética de uma espécie é o passo inicial para sua posterior utilização em programa de melhoramento genético vegetal, podendo resultar em ganhos econômicos (Danner et al., 2011).

Quando se deseja utilizar racionalmente os recursos genéticos existentes, precisamos inicialmente estudar a variabilidade genética, bem como conservar o máximo dessa diversidade, sendo isso pontos iniciais na domesticação de vegetais (Dantas et al., 2012). Uma das medidas de se amenizar o processo de erosão genética, é a criação de bancos de germoplasma, que são locais onde se tem como objetivo armazenar a representação da variabilidade genética de determinada espécie. Germoplasma é definido por Ferreira (2011) como sendo o conjunto de material genético de determinada espécie, que é herdável entre os indivíduos, e, portanto constitui sua base genética.

Uma maneira extremamente interessante de se conservar o material genético de uma espécie seria em condições de campo, porém tal estratégia demanda o uso de extensas áreas, além da necessidade elevada de recursos humanos para manter e conduzir tais coleções (Valois et al., 2001). Portanto, estas coleções devem ser administradas de forma a armazenar o máximo da diversidade possível em menor número de indivíduos de forma a potencializar o uso dos recursos abrigoando o máximo da diversidade existente na espécie.

O entendimento a respeito de como a diversidade genética está estruturada, bem como as relações filogenéticas entre diferentes táxons e dos níveis atuais de fluxo gênico, contribuem de maneira importante para o entendimento sobre a história evolutiva e sobre a dinâmica populacional de diversas espécies (Caballero et al., 2008). Sendo os parâmetros inferidos através das análises genética de populações, de grande importância para a determinação de estratégias de conservação da espécie (Avise, 2010).

3.3 Considerações gerais sobre o cajuzinho do cerrado

A espécie *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae), conhecida popularmente como cajuzinho-do-cerrado, cajuí e cajuzinho-do-campo (Rede de Sementes do Cerrado, 2013), é nativa do Cerrado brasileiro, sendo encontrada nos Estados da Bahia, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Almeida et al., 1998). A espécie apresenta hábito subarborescente com caule subterrâneo (Corrêa, 1984; Almeida et al., 1998).

O cajueiro tem seu sistema reprodutivo predominantemente alógamo (Barros, 1995). Os órgãos reprodutivos da espécie possuem inflorescência terminal na forma de panícula. Suas flores são melíferas (Almeida et al., 1998) e seu principal polinizador é a abelha, sendo *Apis mellifera* a espécie mais comum (Lorenzi, 2006). Sua reprodução ocorre geralmente entre outubro e novembro, sendo a produção de sementes limitada devido à baixa polinização e à alta predação por animais e insetos (Ferrão, 1995). Associam-se a essas características, limitações na polinização, como a tendência dos grãos de pólen de se manterem aderentes à antera, mesmo depois da deiscência, e a incapacidade de algumas flores monóclinas em se transformarem em fruto, apesar do grande número de flores por inflorescência (Ferrão 1995).

A espécie é fonte alimentar de canídeos silvestres neotropicais, como a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e o lobo-guará (*Chrysocyum brachiaru*) que são considerados recolonizadores de áreas abertas por atividade humana, atuando como agente dispersor (Dalponte e Lima 1999). A planta é heliófila (Hoehne 1979), apresentando potencial medicinal e alimentar, podendo ser enquadrada no grupo das fruteiras tropicais.

São poucas as informações contidas na literatura sobre essa espécie, sua atividade farmacológica atribuída pelo conhecimento popular, na qual há a utilização de folhas, cascas, raízes e castanhas como expectorante e cauterizante (Barbosa, 2008), usado no tratamento para inflamação ovariana (Vila Verde et al., 2003), úlceras (Luiz-Ferreira et al., 2008) e atividade antimicrobiana (Silva et al., 2007). Além da atividade medicinal essa espécie produz compostos fenólicos essenciais, cujo efeito inseticida foi descrito por Maia et al. (1998).

Por ser uma espécie de baixo porte, diferentemente do cajueiro comum (*Anacardium occidentale*, L), se torna mais sensível às ações antrópicas e ao fogo, sendo considerada rara e protegida por lei (CEMIG, 2001).

Por ser uma espécie não cultivada, seus frutos são coletados de forma extrativista e em muitos casos de forma desordenada, não havendo o cuidado com a reprodução da espécie. Com isso, as populações naturais de cajuzinho do cerrado podem ser extintas localmente, pois a falta de manejo pode conduzir à redução no número de indivíduos em função da ausência de critérios para a colheita dos frutos. Deve-se considerar ainda que a coleta dos

frutos sem um plano de conservação genética pode resultar no estreitamento da variabilidade genética, devido às restrições na disseminação de sementes e, conseqüentemente, com reflexos no sucesso reprodutivo e na regeneração natural da espécie.

Apesar de não estar inserido no hábito alimentar da maior parte dos brasileiros, o gosto marcante desta espécie chama a atenção da agroindústria. Segundo Corrêa (1984) e Almeida et al., (1998), o pedúnculo e a amêndoa dessa espécie são bastante apreciados para consumo in natura na região do Cerrado, o que torna a espécie potencial alternativa para geração de renda. Para os pequenos produtores a comercialização das frutas in natura representa um incremento na renda familiar (Melo et al., 2013). A venda do cajuzinho, além do valor comercial, também agrega valor social, histórico e cultural as populações regionais.

Por ser uma espécie pouco estudada e não domesticada, o cajuzinho do cerrado vem sofrendo com o extrativismo predatório (Silva et al., 2001). Apesar da sua importância econômica e ambiental, existem poucos trabalhos sobre variação genética em nível molecular que possam contribuir ou direcionar ações voltadas para a conservação da espécie. Como já observado por Londe (2005), se faz necessário gerar informações biológicas, na tentativa de adequar a exploração econômica da espécie, de modo que não haja a utilização predatória ou, até mesmo, a extinção da mesma. Neste caso, não existem trabalhos usando microssatélites, sendo que estudos moleculares envolvendo populações de *Anacardium humile* St. Hill de diferentes áreas geográficas poderiam detectar possíveis padrões de variação genética entre as populações associadas às diferentes regiões do Cerrado.

3.4 Caracterizações e uso de recursos genéticos do Cerrado

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos, com um imenso potencial de uso econômico, dentre quais se destacam os produtos originados dos recursos genéticos vegetais (Guerra e Nodari, 2003). Segundo Goedert (2007) recursos genéticos vegetais nada mais são do que os materiais genéticos vegetais com valor atual ou potencial. Tais recursos são primordiais para a segurança alimentar tanto atual como para as

gerações futuras (Burity et al., 2010) Além disso, são essenciais para a adaptação às alterações ambientais e as necessidades humanas futuras.

Os mesmos fatores que levam ao isolamento por dissimilaridade, entre populações de plantas, são também responsáveis pela subdivisão genética dentro das populações. (Soares et al., 2008). A subdivisão genética local, ou estruturação em parentesco, resulta de um agrupamento espacial de indivíduos, que estão mais intimamente relacionados do que seria esperado em genótipos que estão distribuídos aleatoriamente (Heywood, 1991).

Espécies vegetais com baixas densidades e bancos de sementes discretos, desenvolvem estrutura genética espacial positiva em pequenas escalas, ou seja, as plantas mais próximas espacialmente são mais próximas geneticamente do que o esperado pelo acaso (Soares et al., 2008). Diferentemente, espécies com sobreposição de banco de sementes, alta taxa de fecundação cruzada, estabelecimento raro das plântulas e recrutamento distante da planta mãe, apresentam pouca estruturação genética intrapopulacional (Cavers et al., 2005).

Com o advento das técnicas moleculares, atualmente podemos distinguir a estrutura genética, tanto dentro como entre populações, o que têm ajudado na elucidação dos padrões de fluxo gênico, dispersão e seleção (Cavers et al., 2005). Aliadas às técnicas de autocorrelação espacial, elas possibilitaram o aprimoramento dos métodos de análise e permitiram a estimativa do fluxo gênico aparente dentro de populações, com base na estrutura genética espacial entre plantas (Fenster et al., 2003; Vekemans e Hardy, 2004; Diniz-Filho et al., 2008). Por meio desses métodos, a estrutura genética que tradicionalmente era avaliada apenas em grandes escalas espaciais, entre populações, passou também a ser feita em escala local (Hardy, 2003).

A falta de informações sobre os aspectos genéticos das espécies é um dos principais problemas na avaliação de recursos genéticos e decorre, principalmente, da carência de estudos sobre diversidade genética. Esse problema dificulta o estabelecimento de estratégias que assegurem não só a conservação de populações naturais de plantas ecologicamente importantes, mas também a de outros recursos genéticos potencialmente úteis às populações humanas (Blanco, 2007).

Segundo Sano et al. (2007), o Cerrado apresenta em torno de 40% da vegetação alterada pela atividade humana. Isso se deve ao fato de ser o bioma que possui a menor porcentagem de área legalmente protegida, apenas 5,2 %, integralmente protegida na forma de unidades de conservação (Jepson, 2005). Portanto muitas espécies estão ameaçadas pela ocupação antrópica desordenada do Cerrado e o extrativismo predatório.

Para preservar as espécies com potencial econômico, além da criação de unidades de conservação maiores, devem-se recuperar áreas degradadas e recompor a reserva legal das propriedades rurais com mudas oriundas destas espécies (Hopkin, 2004). No entanto, para se pensar em manutenção de recursos genéticos é importante o conhecimento da variabilidade a fim de garantir implantação de áreas com o mínimo de variabilidade. Outra forma seria o estabelecimento de sistemas de produção comercial. Estudos sobre a variabilidade genética destas espécies geram importantes informações para subsidiar diferentes práticas de manejo, estabelecimento e também etapas iniciais de seleção e melhoramento genético (Faleiro, 2007; Faleiro 2011).

Entre as espécies nativas de potencial agrônomo, as fruteiras do cerrado possuem grande importância. O grande desafio destas espécies envolve sua produção e a comercialização, onde esforços pontuais aprimoram o conhecimento e possibilitam o avanço desse novo mercado (Vieira et al., 2009). No Cerrado são encontradas diversas fruteiras nativas, as quais além de consistirem importante fonte de alimentos para os animais, são produtoras de frutos como pequi, cagaita, araticum, baru, jatobá, mangaba, cajuzinho do cerrado, jenipapo e buriti que podem ser consumidos e (ou) comercializados in natura ou sob diferentes formas, como doces, geleias, bolos, pães, farinhas, biscoitos, sorvetes, pudins, sucos, licores e tortas (Avidos e Ferreira, 2000).

Dados do início dos anos 2000 mostram que em torno de 60 espécies de frutas nativas são conhecidas e utilizadas pela população tradicional que vive no Cerrado, entretanto, o seu uso restringe-se, ainda, ao usuário local e de forma essencialmente extrativista (Silva et al., 2001). Já que muitos frutos nativos, embora conhecidos, não são explorados, os mesmos merecerem uma maior atenção por parte da pesquisa.

3.5 O uso de marcadores moleculares no estudo de espécies nativas do Cerrado

Define-se como marcador molecular qualquer fenótipo molecular originário de um gene expresso ou de um determinado segmento de DNA, que corresponda a uma região expressa ou não do genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Outra definição é que marcadores moleculares de DNA são segmentos de DNA vinculados a locos, que originam a característica de interesse (Alzate-Marin et al., 2005). Essa tecnologia possibilita caracterizar e identificar espécies de tal forma que expõem as mínimas diferenças existentes entre genótipos (Melo e Morais, 2011).

Nos últimos anos, ocorreu um aumento significativo de metodologias de genética molecular (diversos tipos de marcadores moleculares) e suas aplicações para contribuir e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais (Godinho, 2013). As metodologias para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular oferecem informações complementares a outros estudos relativos à conservação e uso de bancos de germoplasma (Faleiro, 2007).

O uso dos marcadores moleculares mudou significativamente as pesquisas nas áreas da Genética e do Melhoramento de Plantas (Borém, 1998). Até a década de 60, eram utilizados marcadores morfológicos baseados em características de fácil identificação, como coloração de pétalas e nanismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Apesar dessa facilidade, a possibilidade de serem afetados por genes controladores de outros caracteres, o reduzido número de marcadores distintos em uma mesma linhagem e o fato de poucas espécies de plantas apresentarem tais características, reduzia a probabilidade de se encontrar associações significativas entre os marcadores e caracteres de importância econômica (Haber, 2007). Apesar de todas as dificuldades e restrições de uso, os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (Borba, 2007).

Nos últimos anos houve grandes avanços na área da biotecnologia, e as diversas técnicas de marcadores moleculares têm permitido indicar, com precisão, as variações genéticas presentes no DNA de um determinado

organismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). O uso de marcadores moleculares é considerado uma das técnicas mais eficientes para caracterização de Bancos de germoplasma (Dantas et al., 2012), já que permite avaliar a diversidade existente entre os acessos e populações diretamente em nível de DNA, associando estas informações para a formação de grupos que reflitam a diferença e/ou a semelhança entre estes (Weiler et al., 2010).

Os parâmetros genéticos populacionais estimados com base em marcadores moleculares podem ser utilizados para diversos fins. Uma das principais utilizações é a conservação de espécies importantes, ou de espécies que estão inseridas em biomas que devem ser preservados, estes parâmetros podem ser úteis na detecção de populações que apresentem diferentes magnitudes de variabilidade genética e que, portanto, requerem diferentes estratégias para sua conservação *in situ* ou *ex situ* (Awise e Hamrick 1996, Newton et al., 1999). Quando, por outro lado, o interesse for a domesticação de espécies e sua utilização econômica, estes parâmetros podem auxiliar na definição de programas de coleta visando a seleção de apenas parte da variabilidade que seja de conveniência para o melhorista (Borém 1998).

Entre as classes de marcadores existentes, os microssatélites são os mais utilizados para caracterização da diversidade em plantas (Filho et al., 2013), sendo amplamente utilizados para a caracterização individual, a investigação de vínculo familiar e o mapeamento genético em seres humanos, animais domésticos e plantas.

A caracterização de germoplasma consiste na observação, mensuração e documentação de características herdáveis (Vicente et al., 2005). Esta caracterização, quando bem conduzida, é capaz de diferenciar acessos, identificar duplicatas, separar classes ou categorias, verificar a variabilidade existente e indicar genótipos mais divergentes (Valls, 2007).

O polimorfismo de tamanho apresentado pelas regiões microssatélites é devido às altas taxas de mutação em relação a outras regiões do DNA. Essa taxa é estimada em 10^{-2} a 10^{-3} por loco por gametas por geração, mas tende a ser altamente variável entre espécies (Ellegren, 2000). Devido à alta taxa de mutação, é de se esperar que o DNA codificante tenha uma baixa densidade de microssatélites, já que profundas transformações implicariam em uma perda de funcionalidade das proteínas a serem codificadas (Oliveira et al., 2006). A

variabilidade evidenciada pelos microssatélites é amplamente utilizada para inferir os níveis de diversidade genética em populações naturais, sendo que a taxa de mutação elevada dos microssatélites os torna particularmente úteis para estimar os níveis de diversidade genética (Väli et al., 2008).

No caso de *Anacardium humile* St. Hill, não há relato de estudos moleculares utilizaram os marcadores microssatélites, no entanto, os mesmos têm sido usados com sucesso em diferentes estudos genéticos na família Anacardiaceae, tais como (Batista, 2013; Caetano, 2005); bem como o uso de outros marcadores moleculares (Santos et al., 2001; Silva, 2009, Silva et al., 2008).

3.6 Fluxo gênico em plantas

O fluxo gênico é um termo coletivo que caracteriza todos os mecanismos resultantes do movimento de genes de uma população para outra. A circulação de genes dentro de populações de plantas está condicionada tanto pela densidade e arranjo espacial dos indivíduos, como pelas relações de natureza genética existentes entre eles (Martins, 1987).

Em plantas, no sentido amplo, o fluxo gênico pode-se estabelecer pelo movimento de pólen ou sementes. Na realidade, o fluxo gênico é uma medida da fertilização, no caso de pólen, ou estabelecimento de indivíduos férteis, no caso de sementes, em razão da distância percorrida da fonte até o local onde a dispersão ocorreu (Levia e Kerster, 1974). Obviamente, nem todo pólen disperso resulta em fertilização e nem toda semente dispersa estabelece indivíduos férteis. Dessa forma, o fluxo gênico, no sentido restrito, pode ser muitas vezes menor que o fluxo gênico potencial.

A subdivisão em áreas menores, levando à interrupção do fluxo gênico pode alterar a estrutura populacional, com implicações nos processos evolutivos (Martins, 1987). O fluxo gênico pode ser considerado um dos principais parâmetros populacionais em trabalhos que objetivam a conservação de espécies, pois o mesmo pode restringir o processo evolutivo por prevenir a adaptação às condições locais e promover a evolução espalhando novos genes e combinações gênicas entre populações de uma determinada espécie

(Slatkin, 1987). A troca gênica restringe os efeitos da deriva genética e da seleção natural, homogeneizando as populações (Seoane et al., 2000).

Mensurar a magnitude do fluxo gênico não é uma tarefa fácil, pois sua estimativa não depende somente do processo de dispersão, mas também do sucesso reprodutivo do indivíduo migrante e do tamanho da população que recebe o migrante (Ennos, 1994). No entanto, há duas classes de métodos, diretos ou indiretos, muito bem discutidas por Slatkin (1985; 1987) para determinar o fluxo gênico, sendo o método mais comum para se medir o fluxo gênico de forma direta em plantas o baseado na observação da dispersão dos grãos de pólen ou das sementes, o que permite a estimativa do fluxo gênico potencial.

Os métodos indiretos utilizam a distribuição da variância genética para se inferir a intensidade de fluxo gênico. Dentre os métodos indiretos, temos aqueles baseados no índice de fixação (F_{ST}), o qual é fundamentado na análise da estrutura genética de populações sendo usado para estimar o número de migrantes por geração (N_m) para um conjunto de populações ou subpopulações. Vale ressaltar que quando o fluxo gênico for estimado via F_{ST} , o mesmo será um fluxo gênico aparente, o qual admite que a estrutura populacional está sob o modelo de ilhas de Wright (1951) e assume equilíbrio entre migração e deriva genética. Crow e Aoki (1984) propõem um método de estimação via F_{ST} o qual corrige a estimativa para pequeno número de populações.

A importância do fluxo gênico está justamente em contrapor os efeitos da deriva genética, permitindo a homogeneização das frequências alélicas, ou seja, o nível de variação dentro da população tende a aumentar e a diferença entre a estrutura genética das diferentes populações tendem a diminuir. Um fluxo gênico restrito pode levar à formação de pequenos grupos de indivíduos geneticamente mais similares, de modo que uma população pode ser constituída de várias subpopulações geneticamente diferenciadas (Fischer et al., 2000).

Teoricamente, o padrão de fluxo gênico existente em um conjunto de populações pode ser descrito por diversos modelos. Futuyma (1992) descreve quatro modelos: a) modelo continente-ilha, onde existe efetivamente, um movimento unidirecional de uma subpopulação grande para uma menor, quase

isolada; b) modelo de ilhas onde a migração ocorre ao acaso dentre um grupo de pequenas subpopulações; c) modelo de alpondras (*stepping-stone*) de modo que cada subpopulação recebe migrantes somente das subpopulações vizinhas; d) modelo de isolamento por distância, onde o fluxo gênico ocorre preferencialmente entre indivíduos mais próximos espacialmente, em subpopulações de distribuição contínua.

Qualquer que seja o método de estimação do fluxo gênico, o valor de N_m tem uma relação muito forte com a magnitude de deriva genética, onde para um $N_m > 1$ o fluxo gênico é a força evolutiva predominante na determinação das frequências alélicas, homogeneizando as populações; $N_m < 1$ A deriva genética tem maior atuação, resultando em significativa diferenciação genética entre as populações (Wright, 1951).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A coleção Biológica “*ex situ*” de *Anacardum humile* St. Hil contém 640 plantas provenientes de 14 municípios (Figura 02). As coletas de propágulos para estruturação da coleção foram realizadas no mês de outubro nos anos de 2011 e 2012, sendo o plantio das mudas na área de recursos genéticos da UFG Regional Jataí realizado em dezembro de 2011 e março de 2013, o qual está ocupando uma área de aproximadamente de 1.720m².

Em cada localidade foram coletados os propágulos do maior número de matrizes possível dentro de cada município, os quais foram levados para a casa de vegetação para a formação das mudas, as quais posteriormente foram transplantadas. Toda a coleção está devidamente identificada em nível de campo e está em processo de informatização.

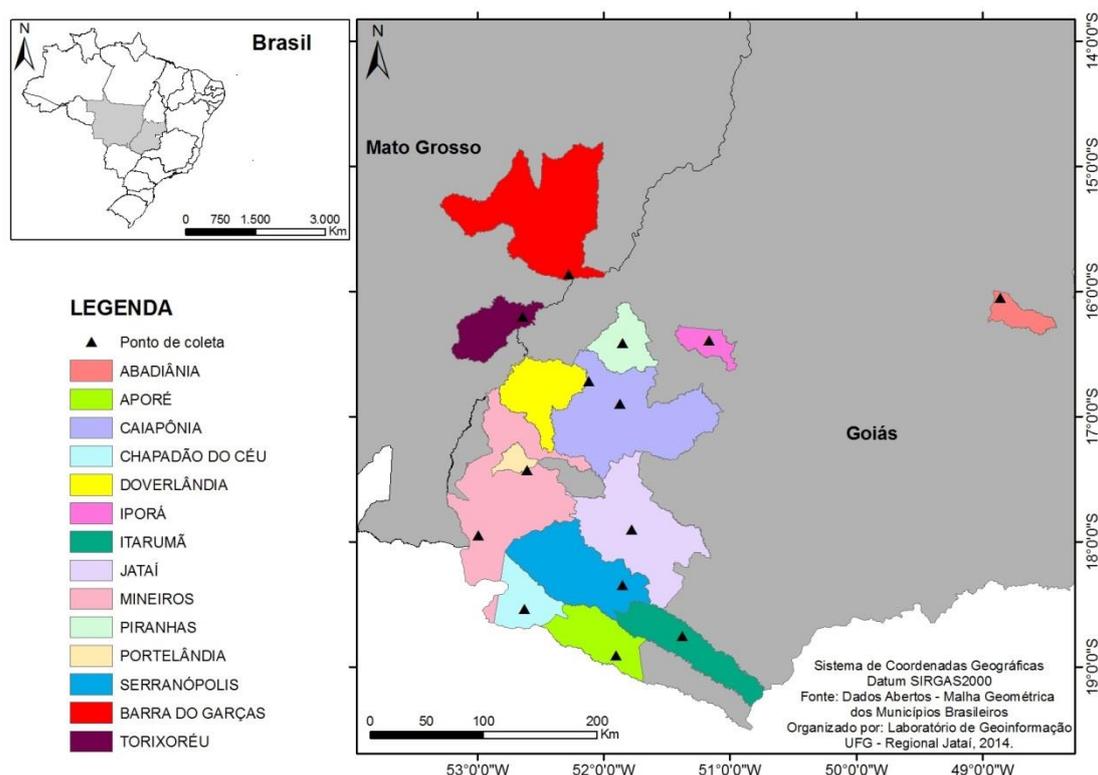


Figura 02: Pontos coletados de acessos de *A. humile* St Hill.

4.1 Coleta de material vegetal e extração de DNA

O material de estudo foram 333 genótipos de *Anacardum humile* St. Hill constituintes da Coleção (Tabela 01) oriundos de 14 localidades do cerrado o

qual está situado na UFG Regional Jataí. Para a obtenção de DNA, folhas foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos, com sílica seca, para serem usadas na extração.

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás - Campus Samambaia, de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987) seguindo as adaptações propostas por Ferreira e Grattapaglia (1998). A integridade e quantificação do DNA extraído foi verificada em gel de agarose a 1%. Com base neste resultado, todas as amostras foram diluídas em água para a concentração de trabalho de 2,5 ng/μL.

Tabela 01. Origem dos 333 indivíduos de *Anacardum humile* St. Hill.

Localidade	Número de indivíduos	Latitude	Longitude	Altitude
Abadiânia/GO	48	16°02'56"	48°51'25"	1138
Aporé/GO	23	18°54'19"	51°54'47"	593
Bar. Garça/MT	22	15°51'36"	52°16'22"	413
Caiapônia/GO	17	16°53'57"	51°52' 21"	772
Chap. Céu/GO	13	18°32'09,1"	52°38'02,7"	816
Doverlândia/GO	19	16°42'58"	52° 16' 01"	597
Iporá/GO	22	16° 23' 28"	51° 10' 06"	614
Itarumã/GO	23	18° 45' 03"	51° 22' 53"	536
Jataí/GO	35	17° 54' 01"	51° 47' 01"	688
Mineiros/GO	23	17°56'06"	52°59'16"	875
Piranhas/GO	27	16°24'35"	51°51'18"	380
Portelândia/GO	21	17° 25' 39"	52° 36' 41"	863
Serranópolis/GO	17	18° 20' 39"	51° 51' 07"	690
Torixoréu/MT	23	16°11'28"	52°38'44"	765

Bar. Garça/MT = Barra do Garça; Chap. Céu/GO = Chapadão do Céu.

As PCRs (Reação em Cadeia da Polimerase) foram feitas em sistemas simples, onde as amostras foram amplificadas com um par de *primers* de cada vez. Cada sistema de amplificação foi montado para um volume final igual a 10 μL (Tabela 02). Foram testado 12 *primers* transferidos por Soares et al., (2013) de *Anacardium occidentale* L. para *Anacardium humile* St. Hill, dos quais 9 se mostraram adequados para o presente estudo (Tabela 03), os demais *primers* não foram utilizados pois os mesmos apresentaram problemas de amplificação.

Tabela 02. Protocolo das Reações em Cadeia de Polimerase demonstrando os reagentes utilizados e suas concentrações de uso e volume, para um sistema de 10µl.

Reagentes	Concentração	Volume (µL)	Concentração final
BSA:	25mg/ml	1,3	3,25mg
DNA:	2,5ng/µL	3	7,5ng
dNTP`s:	2,5µM	0,9	0,225µM
Tampão da enzima c/MgCL ₂ :	10X	1	1x
Primers (F + R):	0,9µM	2,4	0,216µM
Taq-polimerase	5 U	0,15	1U
H ₂ O ultrapura	-	1,25	-
Total	-	10	-

A temperatura de anelamento variou de acordo com cada *primer* (Tabela 03), e as amplificações foram realizadas em termocicladores Gene Amp PCR System 9700 *Applied Biosystems* sobre as seguintes condições: 95°C por 5 min (1 ciclo), 95°C por 1 min, 58°C à 62°C por 1 min (temperatura de anelamento variável de acordo com cada *primer* – ver tabela 03), 72°C por 1 min (30 ciclos); e 72°C por 30 min (1 ciclo).

Tabela 03. *Primers* microssatélites testados para *Anacardium humile* St. Hill.

Loco	Sequência (5' - 3')	Repetição	Produto amplificado (pb)	Ta (°C)
mAoR2*	CAGAACCGTCACTCCACTCC GGAAGGGCATTATGGGTAAG	(CA) ₁₀ (TA) ₆	350 - 380	60
mAoR3	CAGAACCGTCACTCCACTCC ATCCAGACGAAGAAGCGATG	(AC) ₁₂ (AAAAT) ₂	236-256	60
mAoR6*	CAAACTAGCCGGAATCTAGC CCCCATCAAACCCTTATGAC	(AT) ₅ (GT) ₁₂	140-156	60
mAoR11	ATCCAACAGCCACAATCCTC CTTACAGCCCCAAACTCTCG	(AT) ₃ (AC) ₁₆	226-242	62
mAoR12	TCACCAAGATTGTGCTCCTG AAACTACGTCCGGTCACACA	(AC) ₁₂ ARAC(AT) ₄	318-340	60
mAoR16	GGAGAAAGCAGTGGAGTTGC CAAGTGAGTCCTCTCACTCTCA	(GT) ₈ (TA) ₁₇ (GT) ₃	222-260	60
mAoR17	GCAATGTGCAGACATGGTTC GGTTTCGCATGGAAGAAGAG	(GA) ₂₄	138-156	58
mAoR29	GGAGAAGAAAAGTTAGTTTGAC CGTCTTCTTCCACATGCTTC	(TG) ₁₀	304-322	58
mAoR35*	CTTTCGTTCCAATGCTCCTC CATGTGACAGTTCGGCTGTT	(AG) ₁₄	148-158	60
mAoR41	GCTTAGCCGGCACGATATTA AGCTCACCTCGTTTCGTTTC	(GGT) ₈	151-157	60
mAoR42	ACTGTCACGTCAATGGGCATC GCGAAGGTCAAAGAGCAGTC	(CAT) ₉ TAT(CTT) ₇	187-208	62
mAoR52	GCTATGACCCTTGGGAATC GTGACACAACCAAACCAACA	(GT) ₁₆ (TA) ₂	186-204	60

Fonte: Adaptado de Soares et al., 2013. * *primers* não utilizados devido problemas de amplificação.

A verificação da amplificação do DNA foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 3% de concentração. Foi verificada a amplificação da amostra através da intensidade das bandas, sendo posteriormente avaliada a necessidade de diluição. Em seguida, as amostras foram distribuídas em placas para genotipagem, diluídas e misturadas para a formação dos sistemas multiplex de genotipagem, combinando *primers* fluorescentes de diferentes cores (6-FAM, azul; HEX, verde e NED, amarelo) (Tabela 04).

Tabela 04. Relação dos multiplex formados e as fluorescências utilizadas para cada *primer*. 6FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarelo).

Multiplex I	
mAoR11-F	HEX- 5' ATCCAACAGCCACAATCCTC
mAoR52-F	NED- 5' GCTATGACCCTTGGGAACTC
mAoR16-F	NED- 5' GGAGAAAGCAGTGGAGTTGC
Multiplex II	
mAoR3-F	6-FAM- 5' CAGAACCGTCACTCCACTCC
mAoR17-F	6-FAM- 5' GCAATGTGCAGACATGGTTC
mAoR29-F	HEX- 5' GGAGAAGAAAAGTTAGGTTTGAC
mAoR41-F	HEX- 5' GCTTAGCCGGCACGATATTA
mAoR12-F	NED- 5' TCACCAAGATTGTGCTCCTG
mAoR42-F	NED- 5' ACTGTCACGTCAATGGCATC

As amostras submetidas à análise no sequenciador automático de DNA ABI 3500 (*Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) consistiram de um volume final de 10 µL contendo: 1 µL do produto da reação de amplificação, 0,25 µL de marcador interno fluorescente de tamanho padrão (*size standard*) ROX500TM, marcado com fluorescência vermelha, e 8,75 µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*). Essa mistura foi submetida à desnaturação por 5 minutos a 95°C, posteriormente imersas em gelo durante um período de um minuto e submetidas à análise pelo sequenciador ABI-3500 para obtenção dos genótipos.

Após a eletroforese no sequenciador automático, os projetos foram analisados pelo programa Genemapper 3.5 (*Applied Biosystems*) para a visualização dos genótipos. Como os marcadores microssatélites utilizados neste trabalho apresentam motivos de dinucleotídeos foi preciso um critério de

arredondamento com intervalos em pares de bases pré-estabelecidos (Bin) para a determinação dos genótipos, em que a variação dos alelos ocorreu a cada dois pares de bases.

4.2 Análises estatísticas

4.2.1 Avaliação dos locos

Após a genotipagem foi feito um teste utilizando o programa MICRO-CHEKER 2.2.3 (Oosterlhout et al., 2004) a fim de observar erros de genotipagem e a presença de alelos nulos nos locos utilizados. A constatação de presença de alelos nulos também foi feita através do teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde foi utilizado como critério para definir que um loco possui alelos nulos, quando esse não aderiu às proporções de Equilíbrio de Hardy-weinberg em todas as populações.

No presente trabalho adotou-se como loco polimórfico quando o alelo mais comum tem frequência inferior a 0,9.

4.2.2 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas e genotípicas de cada loco foram submetidas ao teste exato de Fisher para verificar a aderência às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, como descrito por Weir (1996), utilizando-se o programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002).

Para minimizar os possíveis erros na obtenção dos genótipos e confirmar a existência de todos os alelos, foi construída uma escada alélica, a partir de uma nova eletroforese com o número mínimo de indivíduos que contemplasse todos os alelos de cada loco.

4.2.3 Desequilíbrio genotípico entre pares de locos

O desequilíbrio genotípico entre pares de locos foi avaliado por meio do teste exato de Fisher. Por esse procedimento, genótipos de dois locos são associados diversas vezes e a estatística é recalculada no novo conjunto de dados. Qualquer associação encontrada entre as frequências gênicas em locos diferentes é geralmente denominada como desequilíbrio de ligação, mesmo quando as associações não são decorrentes de ligação entre os locos (Weir

1996). Para locos nucleares, pressupõe-se que os locos são independentes e, portanto, a associação entre pares de locos não é esperada.

O teste de desequilíbrio genotípico entre pares de locos foi testado com o auxílio do programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002), por meio da média composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Weir, 1979).

4.2.4 Variabilidade genética intrapopulacional

As frequências alélicas foram estimadas para os locos com o auxílio do programa FSTAT (Goudet, 2002), enquanto a diversidade genética intrapopulacional foi estimada utilizando-se o programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002), obtendo-se os parâmetros: número médio de alelos por população (N_a), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) por loco e as heterozigosidade observadas e esperadas médias por população.

Heterozigosidade esperada (H_e) estimada com base em Nei (1978), sendo:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

p_i – frequência estimada do i ésimo alelo;

A heterozigosidade média esperada foi obtida pela média aritmética de todos os locos estudados.

A quantidade de heterozigoto de um determinado loco seguiu os procedimentos de Brown e Weir (1983), em que:

$$H_0 = 1 - \sum p_{ii}$$

p_{ii} – frequência observada de genótipos homozigotos do alelo i ;

A heterozigosidade média observada foi obtida pela soma dos valores de cada loco, dividindo-se pelo número total de locos estudados.

4.2.5 Tamanho efetivo

O tamanho efetivo populacional é um parâmetro crítico em genética de populações, pois este é uma medida da taxa de deriva genética e endogamia (Vencovsky e Crossa, 2003). O tamanho efetivo de populações é o tamanho de uma população idealizada, que tem a mesma medida de deriva em frequências

alélicas, ou a mesma taxa de redução em heterozigosidade, igual à população atual (Vencovsky e Crossa, 2003, 2003).

O tamanho efetivo da população foi estimado segundo (Vencovsky, 1997), pela razão Ne/n , em que:

$$Ne = \frac{n}{1 + f}$$

n é o número de plantas amostradas;

f coeficiente de endogamia intrapopulacional.

Se o valor de f , como índice de fixação, for negativo deve-se assumir o valor zero para o coeficiente de endogamia, devido ao fato de que os valores de f podem ser atribuídos a esta estimativa variam entre 0 e 1. Valores que desviam da unidade significam que na amostragem das populações existe deficiência de indivíduos para contribuir com cruzamentos aleatórios.

4.2.6 Variabilidade interpopulacional e estrutura genética populacional

Para o estudo da variabilidade interpopulacional e estrutura genética, inicialmente foram obtidas as estimativas de diversidade e frequência alélica por loco e por população, utilizando o programa FSTAT (Goudet, 2002). Além das estimativas do índice de fixação intrapopulacional médio por loco e por população e estatísticas F (F_{ST} , F_{IS} e F_{IT}) obtidas através do método proposto por Weir e Cockerham (1984), utilizando o programa GDA que assume o modelo aleatório de acordo com Weir (1996), em que as populações amostradas são consideradas como representativas da espécie e com uma história evolutiva em comum, e que assume também o modelo de alelos infinitos. Em que:

$$f = 1 - \frac{H_0}{H_e}$$

Para verificar as divergências entre as populações, foram calculadas as distâncias genética a partir das frequências alélicas observadas de cada loco (Nei, 1972) utilizando o programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002).

A estrutura genética foi caracterizada por meio das análises de variância das frequências alélicas (Weir, 1996), considerando-se as quatorzes

populações, para determinar a estrutura genética molecular entre populações, foram utilizados os parâmetros de F (Wright, 1951), F_{ST} estimativa de divergência entre populações, F_{IS} e F_{IT} estimativas de excesso de heterozigotos (< 0) e deficiência (> 0) dentro de cada população e no conjunto de populações (Weir e Cockerham, 1984), calculados com o programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002), sendo:

$$F_{IT} = \frac{(H_{et} - H_o)}{H_{et}}$$

Em que:

H_o = heterozigosidade observada (do indivíduo);

H_{et} = heterozigosidade esperada da população total.

$$F_{ST} = \frac{(H_{et} - H_{es})}{H_{et}}$$

Em que:

H_{es} = heterozigosidade esperada se a população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE);

H_{et} = heterozigosidade esperada da população total.

$$F_{IS} = \frac{(H_{es} - H_o)}{H_{es}}$$

Em que:

H_o = heterozigosidade observada (do indivíduo);

H_{es} = heterozigosidade esperada se a população está em HWE (da subpopulação).

Para verificar se os valores médios desses índices foram significativamente diferentes de zero, foi estimado o intervalo de confiança a 95% de probabilidade pelo método de reamostragem *bootstrap*, utilizando-se 10.000 repetições por loco, utilizando-se o programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002).

Distância genética (D) entre duas populações estimadas segundo Nei (1972):

$$D = \ln \hat{I}$$

Sendo (\hat{I}) - o índice de identidade genética;

p_{ix} = frequência do alelo i na população x ;

p_{iy} = frequência do alelo i na população y .

$$\hat{I} = \frac{\sum (P_{ix} P_{iy})}{[(\sum P_{ix}^2)(\sum P_{iy}^2)]^{0,5}}$$

Para verificar se os valores médios de f apresentaram diferenças significativas de zero, foi estimado o intervalo de confiança a 95% de probabilidade pelo método reamostragem de *bootstrap*, utilizando-se 10000 reamostragens sobre os locos pelo programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002).

4.2.7 Fluxo gênico

O fluxo gênico aparente (N_m) foi estimado indiretamente, de acordo com o modelo de ilha proposto por Crow e Aoki (1984), o qual corrige a estimativa para pequeno número de populações, de acordo com a equação:

$$N_m = \frac{[\left(\frac{1}{F_{ST}}\right) - 1]}{4a}$$

$$a = \left[\frac{n}{(n-1)}\right]^2$$

Onde:

N_m = número de migrantes por geração;

a = correção para o número finito de populações;

F_{ST} = medida da diversidade genética entre populações (Wright, 1931).

4.2.8 Análise de agrupamento

Para a análise de divergência genética entre os genótipos utilizou-se a distância genética de Nei (1972) e para o agrupamento dos genótipos utilizou-se o método UPGMA (*Unweighted pair-group method using an arithmetic average*). O ponto de corte em cada estágio do agrupamento no dendograma foi estabelecido conforme o método de Mojena (1977), utilizado o valor de $k = 1,25$ como regra de parada na definição do número de grupos, conforme Milliga e Cooper (1985).

Para testar a hipótese de "isolamento por distância" uma matriz de distâncias genética de Nei (1972) entre as localidades foi correlacionada com uma matriz de distância geográfica entre as localidades por meio do teste de Mantel (Mantel, 1967), utilizando-se o aplicativo computacional GENES (Cruz, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Diversidade Genética

5.1.1 Diversidade dos Locos

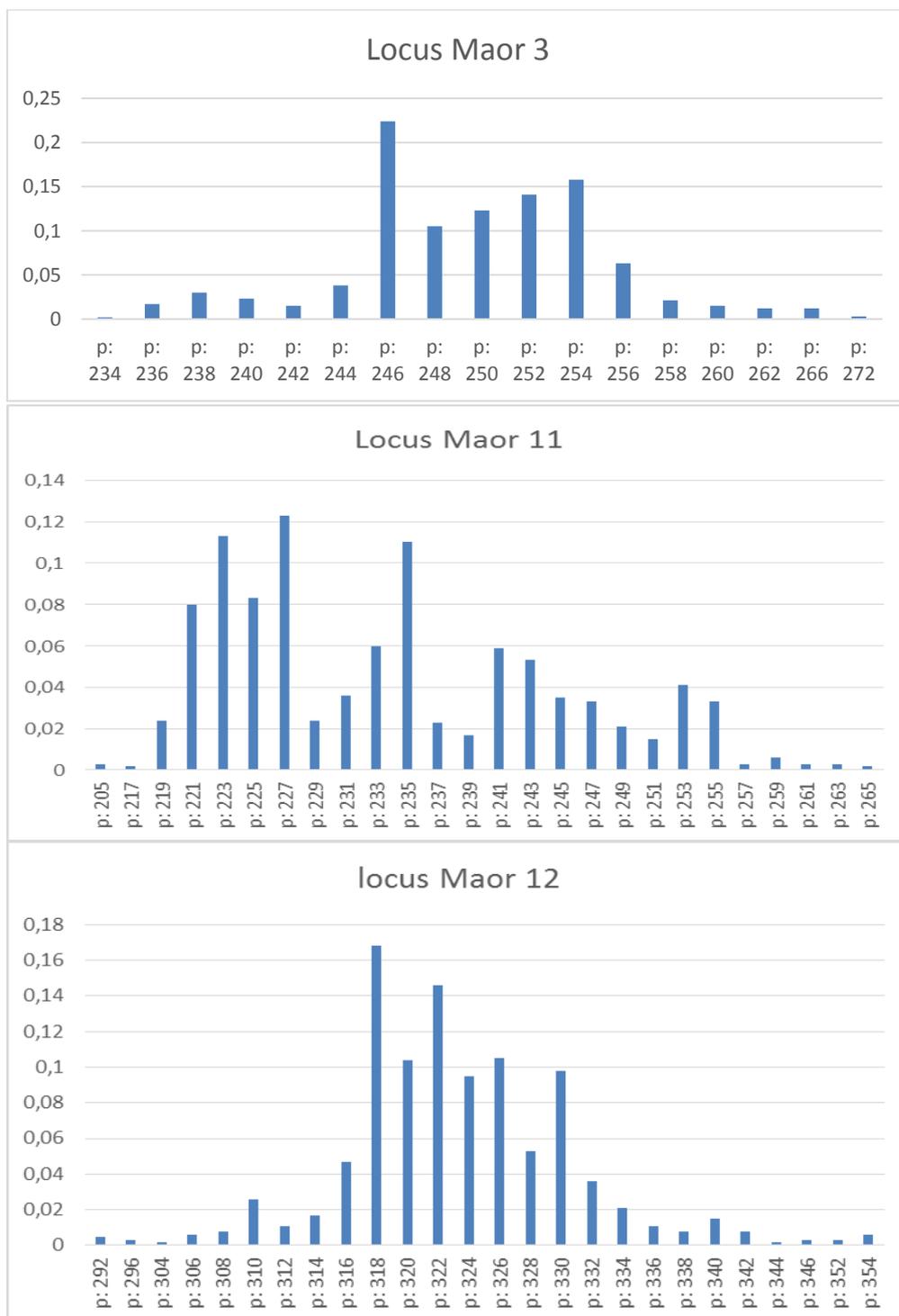
Os nove locos SSR detectaram um total de 185 alelos nos 333 indivíduos avaliados, com uma média de 20,55 alelos por loco (Tabela 06). O número de alelos observados neste trabalho foi satisfatório, considerando o que deve ser esperado para locos microssatélites que são potencialmente multialélicos (Schlötterer e Tautz, 1992; Ellegren, 2004). Comparando-se com outras espécies do Cerrado (Tabela 06) o número de alelos apresentados é um indicativo de grande diversidade genética da espécie em questão. Seguindo o critério pré-estabelecido (frequência do alelo mais frequente inferior a 0,9), todos os locos foram polimórficos, com o número de alelos variando de 12 (Maor 41) a 26 (Maor 11 e 12) alelos. O elevado polimorfismo encontrado indica que os SSR usados podem detectar variação alélica entre os indivíduos.

Tabela 05. Índices de diversidade genética, coeficiente de endogamia, e diferenciação genética de nove locos SSR em 333 acessos *A. humile* St. Hill mantidos na coleção de gerrmoplasma da UFG.

Loco	Na	H _e	H _o	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
Maor 3	17	0,872	0,756	0,018	0,141	0,125
Maor 11	26	0,929	0,672	0,222	0,281	0,076
Maor 12	26	0,903	0,669	0,223	0,262	0,050
Maor 16	22	0,869	0,693	0,142	0,207	0,076
Maor 17	22	0,914	0,846	-0,022	0,081	0,102
Maor 29	22	0,897	0,636	0,233	0,295	0,082
Maor 41	12	0,765	0,492	0,288	0,362	0,104
Maor 42	17	0,850	0,447	0,381	0,481	0,162
Maor 52	21	0,883	0,693	0,138	0,221	0,097
Média	20,55	0,876	0,656	0,177	0,256	0,096
Total	185					

Na: número de alelos; H_e - Heterozigosidade esperada; H_o - Heterozigosidade observada; F_{IS} - Diversidade genética dentro da população; F_{IT} - Índice de fixação para a população; F_{ST} - Diversidade genética entre populações. Intervalo de confiança 0,05.

Figura 03. Histogramas de distribuição das frequências alélicas de nove locos SSR em 333 indivíduos de *A. humile* St. Hill constituintes da coleção de germoplasma da UFG/Regional Jataí.



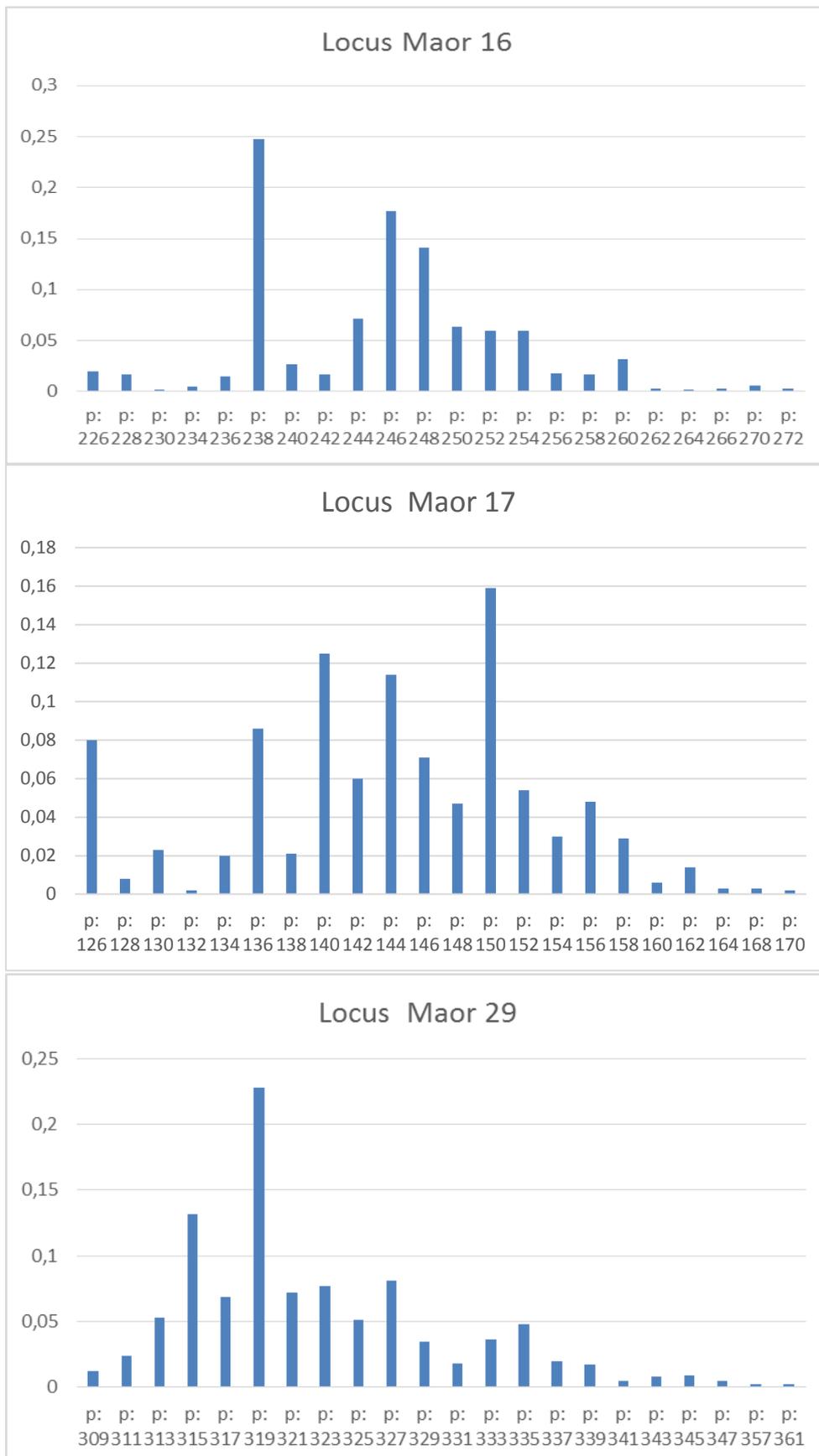


Figura 03. Continuação.

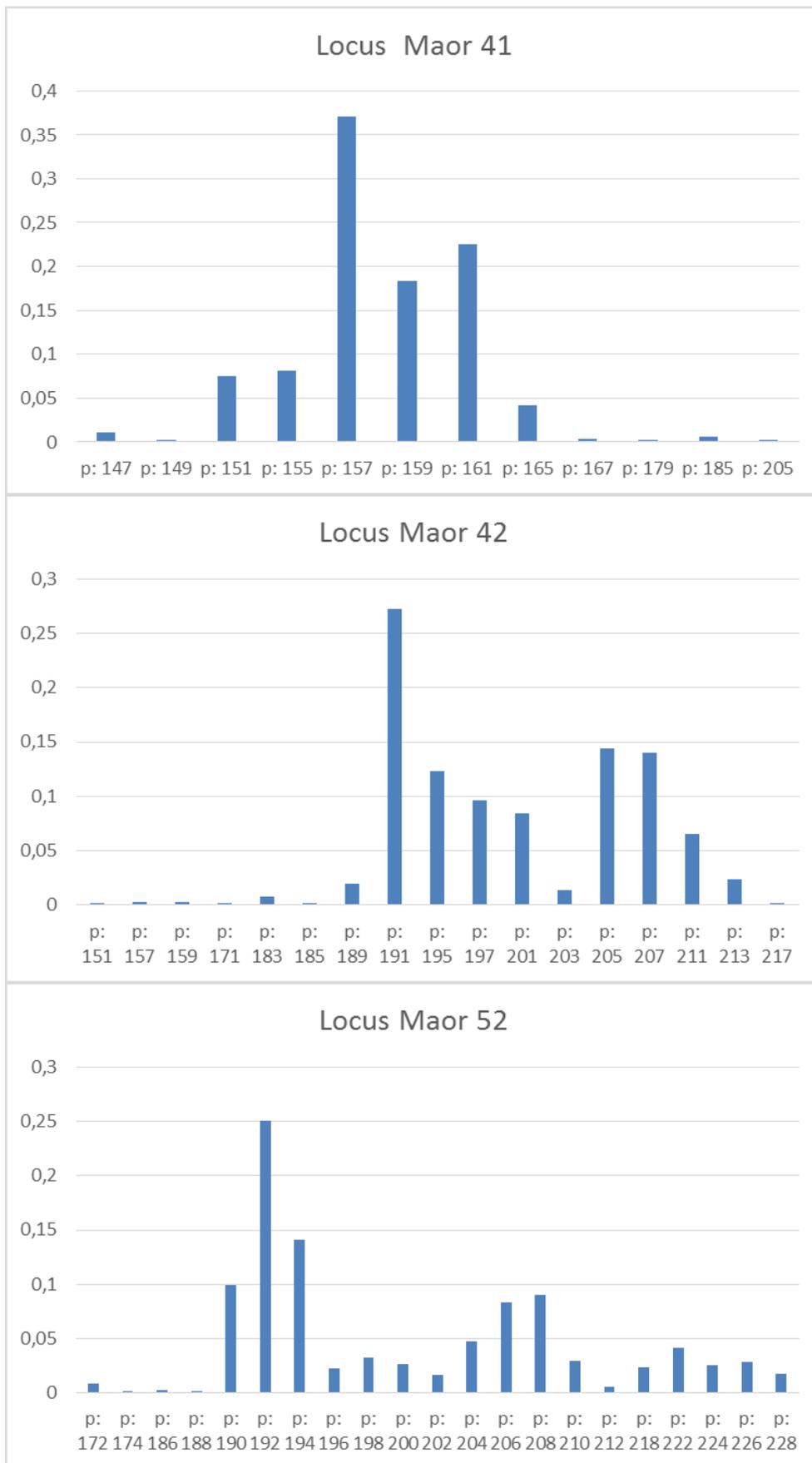


Figura 03. Continuação.

O alto polimorfismo dos SSR de *A. humile* St. Hill pode ser explicado pela amplitude geográfica das áreas de coleta e pelo baixo nível de domesticação e melhoramento da espécie. Este comportamento é verificado e descrito para outras espécies silvestres como *Caryocar brasiliense* (Fernandes, 2008); *Solanum spp* (Moura et al., 2009) e *Tabebuia aurea* (Silva, 2010).

As distribuições das frequências alélicas variaram entre os locos (Figura 02). Os locos Maor 11, Maor 17 e Maor 52 tiveram a distribuição mais homogeneia dos alelos. Os demais locos tiveram uma distribuição menos uniforme, indicando maior frequência de uns poucos alelos, sempre predominando 5 a 6 alelos por loco. Este alto número de alelos e a distribuição das frequências entre os locos podem influir nos altos valores de H_e encontrados, como já foi constatado para outras espécies como *Myrciaria dúbia* (Rojas, 2011).

As Heterozigosidades esperadas (H_e) foram altas para a maioria dos locos SSR, variando de 0,765 (loco Maor 41) a 0,929 (loco Maor 11), com uma média de 0,876, valor esse maior do que o geralmente apresentado por outras espécies do Cerrado (Tabela 07), indicando uma probabilidade de 87,6% de detectar ao acaso 2 alelos diferentes nos acessos da Coleção de germoplasma.

Tabela 06. Estimativas de diversidade genética para frutíferas do Cerrado

Espécie	n	AP	H_e	H_o	f
Cagaita ¹	116	10,43	0,442	0,458	-0,037
Araticum ²	32	19,30	0,906	0,805	0,113
Lobeira ³	240	3,90	0,334	0,346	-0,035
Baru ⁴	775	2,50	0,226	0,221	-
Média	290,8	9,03	0,477	0,457	0,0136

n: número de indivíduos; AP: número médio de alelos; H_o : heterozigozidade observada; H_e : heterozigozidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; f: índice de fixação. 1 - Zucchi et al., 2003; 2- Pereira et al., 2008; 3- Moura, 2007; 4- Soares, 2008.

Segundo Brown e Weir (1983) a heterozigosidade ou diversidade genética é a medida mais importante e a mais utilizada para estimar a variabilidade genética e menos sensível às variações no tamanho amostral, quando comparada com outras medidas, como a porcentagem de locos polimórficos e o número médio de alelos por locos, além do fato de possuir fácil interpretação em termos genéticos.

Os valores de heterozigosidade observada (H_o) variaram de 0,447 a 0,846, com uma média de 0,656, sendo inferiores a H_e em todos os locos, indicando deficiência de heterozigotos (Tabela 07).

5.1.2 Variação entre e dentro das populações

Não houve nenhuma significância estatística para associações não aleatórias entre os genótipos dos nove locos para as localidades estudadas, o que sugere que as análises poderiam ser realizadas assumindo-se a independência estatística entre os locos.

O número de alelos variou entre 60 para a população de Piranhas e 125 para Jataí, com uma média de 85,3 alelos por população. Os resultados demonstram um elevado conteúdo informativo associado aos marcadores microsatélites, o qual também foi encontrado por Moura et al., (2009) reforçando sua utilidade em estudos de Coleções. Os nove locos microsatélites apresentaram altos níveis de polimorfismo tanto dentro como entre as 14 populações.

A relação entre o tamanho efetivo populacional e o tamanho da amostra (N_e/n) é de grande importância para estratégias de conservação da espécie, indicando a representatividade genética das amostras. A estimativa está associada com as condições de heterozigose e, portanto, os valores observados ($N_e/n = 0,86$) reafirmam a existência de endogamia para as populações estudadas. Um manejo adequado dessas populações seria uma medida importante, considerando-se a relevância de *A. humile* St. Hill para as populações tradicionais. Dentre as populações estudadas somente Mineiros apresentou uma relação N_e/n igual a 1 e uma provável explicação seria o fato de tal população está localizada dentro do Parque Nacional das Emas, uma unidade de proteção integral, o qual provavelmente contribuiu para o baixo nível de endogamia apresentado. Faz-se necessários estudos mais detalhados sobre as populações de Mineiros e Barra do Garça, visto que a população de Barra do Garça também se encontra dentro de um parque (Parque Nacional Serra Azul) e mesmo assim apresentou uma endogamia ($f = 0,185$) relativamente alta. Estudos mais detalhados poderão fornecer indícios sobre o qual eficiente em termos de preservação da biodiversidade é um parque.

Como podem ser vistas na Tabela 08, as heterozigosidades observadas (H_o) foram menores que as esperadas (H_e) em treze populações e não houve uma variação muito grande entre elas, sendo que a única exceção foi à localidade de Mineiros, a qual apresentou uma heterozigosidade observada (H_o) (0,763) maior que a esperada (H_e) (0,750). A heterozigosidade observada variou de 0,514 (população de Piranhas) a 0,763 (população de Mineiros), enquanto que, a esperada, de 0,664 (população Piranhas) a 0,854 (população de Jataí), com médias de 0,660 e 0,791, respectivamente. Zucchi et al., (2004) estimaram, para dez populações de *Eugenia dysenterica*, uma espécie arbórea do Cerrado brasileiro, uma heterozigosidade média esperada de 0,442, valor este bem inferior ao encontrado no presente estudo, mais uma vez confirmando a elevada diversidade genética observada para a espécie.

Vale ressaltar que mesmo quando ocorre redução no tamanho populacional, mesmo que o número de alelos seja reduzido, o grau de heterozigosidade e a diversidade genética podem permanecer tão altos quanto na população original, pois na maioria das vezes, os alelos perdidos por deriva são raros, os quais contribuem pouco para o nível de heterozigosidade (Nei, 1975).

Tabela 07. Caracterização das 14 populações de *A. humile* St. Hill baseado em nove locos microssatélites.

Populações	N	Na	Ne	H_e	H_o	f
Abadiânia	48	105	0,831	0,837	0,668	0,202
Aporé	23	80	0,968	0,749	0,724	0,033
Barra do Garça	22	86	0,843	0,827	0,676	0,185
Caiapônia	17	77	0,861	0,807	0,679	0,161
Chapão do Céu	13	75	0,896	0,788	0,700	0,115
Doverlândia	19	88	0,864	0,819	0,693	0,157
Iporá	22	73	0,814	0,715	0,555	0,227
Itarumã	23	102	0,822	0,834	0,657	0,216
Jataí	35	125	0,813	0,854	0,660	0,229
Mineiros	23	78	1,000	0,750	0,763	-0,016
Piranhas	27	60	0,813	0,664	0,514	0,229
Portelândia	21	64	0,881	0,768	0,666	0,135
Serranópolis	17	83	0,863	0,835	0,705	0,158
Torixoréu	23	99	0,763	0,828	0,574	0,310
Média	23,79	85,3	0,860	0,791	0,660	0,169

N - numero acessos por população; Na- Numero de alelos na população; Ne: tamanho efetivo da população; H_e - Heterozigosidade esperada; H_o Heterozigosidade observada; f - coeficiente de endogamia intrapopulacional.

Tabela 08. Teste exato de Fisher de ajustamento das proporções genotípicas observadas, nas proporções esperadas sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg em 14 populações de *A. humile* St. Hill.

População	locos								
	Maor 3	Maor 11	Maor 12	Maor 16	Maor 17	Maor 29	Maor 41	Maor 42	Maor52
Abadiânia	0,0332*	0,0000*	0,0000*	0,0568	0,0020*	0,3298	0,0226*	0,0000*	0,0001*
Aporé	0,2722	0,0509	0,1803	0,1687	0,6421	0,4270	0,0000*	0,3900	0,1079
B. do Garça	0,4340	0,0040*	0,0007*	0,7353	0,5902	0,0918	0,2213	0,0014*	0,0007*
Caipônia	0,2258	0,0005*	0,1768	0,1227	0,1285	0,6706	0,0000*	0,0000*	0,1363
Cha do céu	0,9523	0,0659	0,0112*	0,0074*	0,1933	0,2224	0,0478*	0,0138	1,0000
Doverlândia	0,2619	0,0084*	0,0020*	0,0468*	0,9319	0,0130*	0,0000*	0,0000*	0,0567
Iporá	0,4142	0,0002*	0,8445	0,1299	0,1781	0,0000*	0,4970	0,2795	0,0011*
Itarumã	0,5545	0,1333	0,0011*	0,2178	0,5759	0,0210*	0,0000*	0,0008*	0,0680
Jataí	0,1334	0,0000*	0,0104*	0,1405	0,4626	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0025*
Mineiros	0,2819	0,6718	0,6834	0,5135	0,8839	0,0143*	0,1108	0,3767	0,0277*
Piranhas	0,7198	0,0000*	0,0036*	0,3362	0,6586	0,0309*	0,0088*	0,2473	0,2733
Portelândia	0,0028 *	0,3600	0,0534	0,0020*	0,4100	0,2608	0,1404	0,0028*	0,3997
Serranópolis	0,3656	0,2241	0,0104*	0,4235	0,2272	0,0000*	0,1976	0,0070*	0,8040
Torixoréu	0,0142*	0,0004*	0,0000*	0,0027*	0,1873	0,0019*	0,0051*	0,0000*	0,3096

B. do Garça = Barra do Garça; Cha.do céu = Chapadão do céu. * Loco em desequilíbrio de Hardy Weinberg, $P < 0,05$.

Avaliando as probabilidades observadas para cada um dos locos, dentro de cada uma das populações, é possível observar que 45,2% dos locos não estão EHW (tabela 08). Os presentes desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser explicados devido ao sistema reprodutivo da espécie: pode estar ocorrendo cruzamentos biparentais ou endogâmicos.

5.1.3 Estrutura genética

O termo estrutura genética de populações, será aqui utilizado como sinônimo da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações.

O F_{ST} mensura a redução da heterozigosidade de uma subpopulação relativamente à população total, ou seja, a diferenciação genética entre subpopulações. Quando se encontra valores de F_{ST} baixos pode ser que ocorreu intenso fluxo gênico no passado, se há valores muito elevados provavelmente as populações se encontram isoladas. Segundo Hartl e Clark (2010) valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam baixa estruturação genética; valores entre 0,05 e 0,15 indicam estruturação genética moderada, valores entre 0,15 e 0,25 estão relacionados à estruturação alta e valores acima de 0,25 indicam uma forte estruturação genética. O valor de F_{ST} encontrado no presente trabalho igual a 0.096 (tabela 09). De acordo com os valores de F_{ST} para o conjunto de locos avaliados, os locos Maor 3 e Maor 42 (0,124 e 0,161

respectivamente) indicam que os mesmos podem ser úteis para discriminar populações de *A. humile* St. Hill de diferentes regiões geográficas.

O coeficiente de endogamia intrapopulacional ($F_{IS} = 0,177$) sugere a existência de um déficit de heterozigotos, manifestados pelos valores positivos deste índice, ou seja, 17,7% dos cruzamentos dentro das populações podem ser endogâmicos.

O índice de fixação para a espécie como um todo (F_{IT}) foi 0,256 (Tabela 09), ou seja, existe uma probabilidade de 25,6% de que um dos alelos de um indivíduo da Coleção sejam iguais.

As estimativas apresentaram altos valores dos coeficientes de fixação do conjunto total das populações (F_{IT}) e de endogamia intrapopulacional (F_{IS}), sugerem que a variabilidade genética esteja estruturada moderadamente nas populações de *A. humile* St. Hill e que a diferenciação entre elas ocorre principalmente por acasalamentos não aleatórios dentro e entre populações, e não somente por deriva. Isto sugere que o endocruzamento esteja determinando a estrutura genética destas populações, causando a diferenciação entre elas pelo aumento de homozigotos dentro das populações (WRIGHT, 1931).

Uma maior diversidade dentro das populações está de acordo com estudos realizados em populações naturais de plantas (Zimback et al., 2004; Gois, 2010 e Melo, 2010). A maior variabilidade genética dentro de populações do que entre, é característica de espécies alógamas ou de sistema misto de reprodução, predominantemente alógama e com eficiente mecanismo de dispersão de pólen e sementes (fluxo gênico) (Kageyama et al., 2003; Loveless & Hamrick, 1984).

Uma provável explicação para a baixa variação genética entre as populações estudadas se deve ao fato de que cada localidade (população) ser formada por indivíduos espacialmente distantes, ou seja, apresentam genótipos de diferentes regiões dentro dos seus respectivos municípios.

Tabela 09. Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade e estrutura genética em 14 populações de *A. humile* St. Hill, para 9 locos microssatélites.

Locos	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
Maor 3	0.0184	0.1407	0.1245
Maor 11	0.2216	0.2809	0.0761
Maor 12	0.2230	0.2617	0.0498
Maor 16	0.1417	0.2068	0.0759
Maor 17	-0.0224	0.0813	0.1015
Maor 29	0.2327	0.2953	0.0815
Maor 41	0.2879	0.3619	0.1039
Maor 42	0.3805	0.4807	0.1616
Maor 52	0.1377	0.2211	0.0966
Global	0.1771	0.2563	0.0963

F_{IT}: coeficiente de endogamia para o conjunto de populações; F_{IS}: coeficiente de endogamia intrapopulacional; F_{ST}: a porção da variação total encontrada entre todas as populações. Intervalo de confiança = 95% obtidos por *bootstrapping* com 10000 replicações.

5.1.4 Fluxo gênico

O fluxo gênico aparente (N_m) entre as populações, estimado de acordo com Crow e Aoki (1984), foi igual 2,02, ou seja, existem pelo menos 2 migrantes por geração. Este resultado é inferior ao encontrado por Carvalho et al., (2012) que caracterizou o fluxo gênico em populações naturais de *A. humile* St. Hill via RAPD (*Random Amplified Polymorphic*), com $N_m = 3,78$. Esta diferença pode ser justificada pelas características do marcador molecular utilizado em cada um dos estudos, em que Carvalho utilizou um marcador dominante, e no presente estudo foi utilizado o microssatélite, o qual é um marcador codominante, sendo o mesmo mais informativo que o marcador RAPD, gerando resultados mais consistentes.

Os valores de fluxo gênico encontrados indica que a estrutura metapopulacional de *A. humile* St. Hill ainda não está comprometida, pois de acordo com Slatkin e Barton (1989) e Wright (1951) os valores de N_m , determinam, por si só, se a deriva genética pode produzir uma substancial variabilidade genética entre populações de diferentes locais. Segundo os autores citados acima, se o $N_m > 1,0$ o fluxo gênico é alto o suficiente para prevenir uma diferenciação em função da deriva genética.

Apesar de o fluxo gênico obtido nesse trabalho ter sido relativamente alto, com média de 2,02 migrantes por geração, sua interpretação tem que ser

cuidadosa, uma vez que sua inferência se faz ao fluxo gênico passado, resultado de antigas trocas gênicas, não refletindo a atual situação das populações. Quando este cenário ocorre há indícios de que a divergência genética entre as subpopulações é recente e que a deriva genética é o principal fator evolutivo que causa a divergência genética entre as populações (Hardy et al., 2003) o que vem a ser corroborado por Klink e Moreira 2002, os quais constaram que a fragmentação do cerrado e um evento relativamente recente, tendo sua intensificação na década de 60, com a construção de Brasília e o estabelecimento de uma malha rodoviária, tornando acessíveis regiões até então remotas.

Altos níveis de fluxo gênico poderiam, em condições naturais, diminuir a perda de diversidade genética e manter a viabilidade das populações no longo prazo. Entretanto, considerando a situação praticamente irreversível da fragmentação das populações de *A. humile* St. Hill e o extrativismo dos frutos impedindo a dispersão natural há possibilidades de aumento nos níveis de diferenciação genética entre essas populações nas próximas gerações. Portanto, seria interessante realizar estudos genéticos nas progênes, para avaliar o fluxo alélico contemporâneo.

5.1.5 Distância genética

A matriz de distância genética foi gerada utilizando-se a distância genética de Nei (1972). Esta matriz foi usada na construção de um dendograma das 14 localidades de *A. humile* St. Hill mostrando a relação genética existente entre elas (Figura 03). As distâncias genéticas de Nei (1972), calculadas entre as populações variaram de 0,231 (entre Jataí e Portelândia) a 1,479 (entre Céu e Piranhas) - (Tabela 10).

Tabela 10. Distâncias genética de Nei (1972) (diagonal inferior à esquerda) e Matriz de distância geográfica (Km) entre as populações (diagonal superior à direita)

	Ser	Min	Bar.	Por	Cai	Pir	Dov	Aba	Tor	Jti	Ita	Apo	Ipo	C. céu
Ser	0	453	366	250	487	372	336	388	373	487	429	428	407	405
Min	0,362	0	340	289	86,3	245	222	79	112	156	294	179	62,4	310
Bar	0,772	0,740	0	132	300	95,7	123	341	233	243	87,8	178	280	54,9
Por	0,325	0,528	0,866	0	284	123	94	261	179	258	180	192	228	159
Cai	0,473	0,457	0,676	0,565	0	205	198	155	114	76,4	236	123	85,3	259
Pir	1,072	1,208	0,596	1,057	0,572	0	45,9	243	141	155	71,3	86,8	185	70,8
Dov	0,910	0,987	0,838	0,807	0,523	0,688	0	218	111	164	117	97,3	160	113
Aba	0,503	0,443	0,510	0,458	0,463	0,481	0,632	0	114	211	314	211	83,9	323
Tori	0,454	0,427	0,639	0,367	0,304	0,579	0,528	0,363	0	128	201	102	49,7	210
Jti	0,372	0,357	0,680	0,231	0,336	1,062	0,673	0,379	0,257	0	169	68,8	128	196
Ita	0,402	0,292	0,729	0,388	0,369	1,266	0,692	0,433	0,332	0,160	0	116	369	33,6
Apo	0,736	0,656	0,727	0,952	0,811	1,242	1,375	0,552	0,907	0,723	0,803	0	129	137
Ipo	0,812	0,891	0,680	0,714	1,203	1,195	1,133	0,654	0,885	0,772	1,002	0,585	0	253
C. céu	0,335	0,386	0,881	0,251	0,552	1,479	0,885	0,589	0,343	0,193	0,299	0,845	0,761	0

Ser= Serranópolis; Min= Mineiros; Bar= Barra do Garça; Dov= Doverlândia; Cai= Caiapônia; Pir= Piranhas; Por= Portelândia; Abd= Abadiânia; Tor= Torixoréu; Jti= Jataí; Ita= Itarumã; Apo= Aporé; Ipo= Iporá; C. céu= Chapadão do Céu.

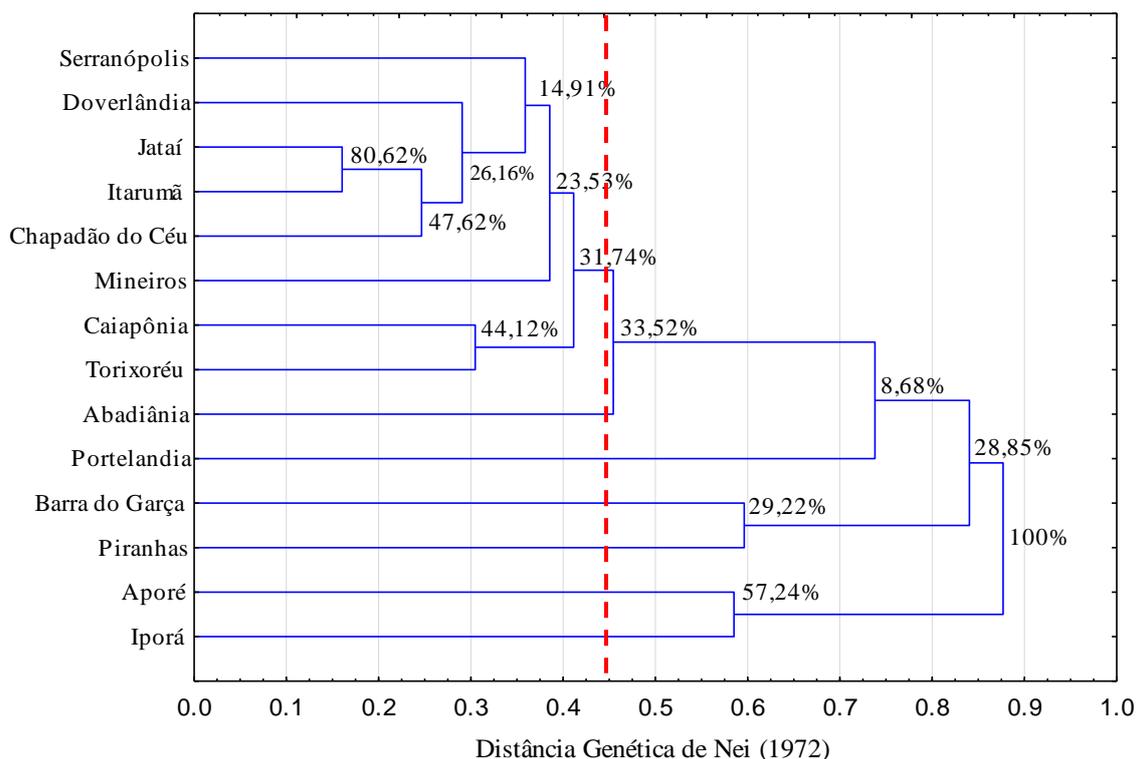


Figura 04. Padrão de divergência genética entre as quatorze populações de *A. humile* St. Hill definido pelo agrupamento UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei (1972). Correlação cofenética igual 0,87% (10000 reamostragens *bootstrap* para porcentagem de consistência dos nós).

A matriz de distância genética foi utilizada para a construção do dendograma, por meio do método UPGMA (Figura 04). O ajuste entre a matriz de distância genética e o dendograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC), coeficiente esse que traduz a relação momento-produto, calculado entre os elementos da matriz original e os da matriz cofenética, resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento, depois da construção do dendograma. Valores de CCC superiores a 0,8 indicam boa representatividade entre as distâncias (Bussab et al., 1990). A correlação cofenética do agrupamento UPGMA desta matriz foi alta (0,876).

Com base no ponto de corte segundo Mojena, 1977 (0,446) foi possível distinguir sete grupos geneticamente distintos com o 1º constituídos por 8 localidades (Caiapônia, Chapadão de Céu, Doverlândia, Itarumã, Jataí, Mineiros, Serranópolis e Torixoréu) e os demais grupos formados por

localidade individuais, sendo esses grupos 2º (Abadiânia), 3º (Portelândia), 4º (Barra do Garça), 5º (Piranhas), 6º (Aporé) e 7º (Iporá).

O valor de consistência dos nós fornece uma confiança para a subestruturação encontrada nas quatorze localidades. Para testar a relação entre a matriz de distância genética e a matriz cofenética, uma análise de correlação matricial (r) foi feita. A significância da análise de correlação foi estimada utilizando-se o teste de Mantel.

O teste de Mantel revelou ausência de associação entre matriz de distância genética de Nei (1972) e a distância geográfica. O coeficiente de correlação (-0,181) foi negativo e não significativo. Este resultado difere do obtido por Melo et al. (2009), onde teste de Mantel aplicado estabeleceu uma correlação cofenética com valores de $r = 0,82$, significando que as distâncias geográficas entre as populações *Lychnophora ericoides* Less amostradas estão correlacionadas com a distância genética. Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que as frequências alélicas entre as populações não podem ser explicadas pela distância geográficas entre elas (Figura 05) sendo a deriva genética a causa mais provável.

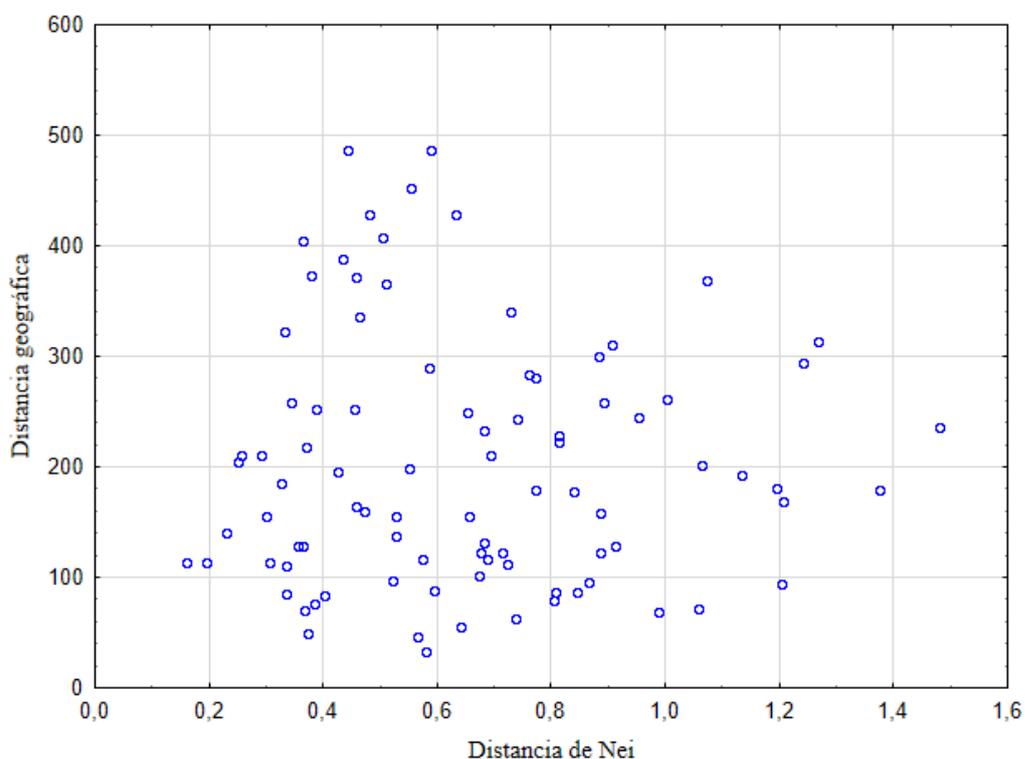


Figura 05. Relação entre os valores da distância genética de Nei (1972) e a distância geográfica (km) para todos os fragmentos de *A. humile* St. Hill. Teste de Mantel para correlação ($r = -0,181$).

A figura (06) apresenta a dispersão dos acessos, indicando que indivíduos pertencentes a populações situadas geograficamente distantes estão próximos no plano cartesiano de dispersão. Isto confirma os indícios anteriores de que a distância geográfica não é fator preponderante na divergência genética das quatorze populações de *A. humile* St. Hill, os quais estão agrupados próximos de indivíduos geograficamente distantes, o que confirma que a variabilidade genética é maior dentro das populações do que entre elas, provando a consistência do teste de Mantel.

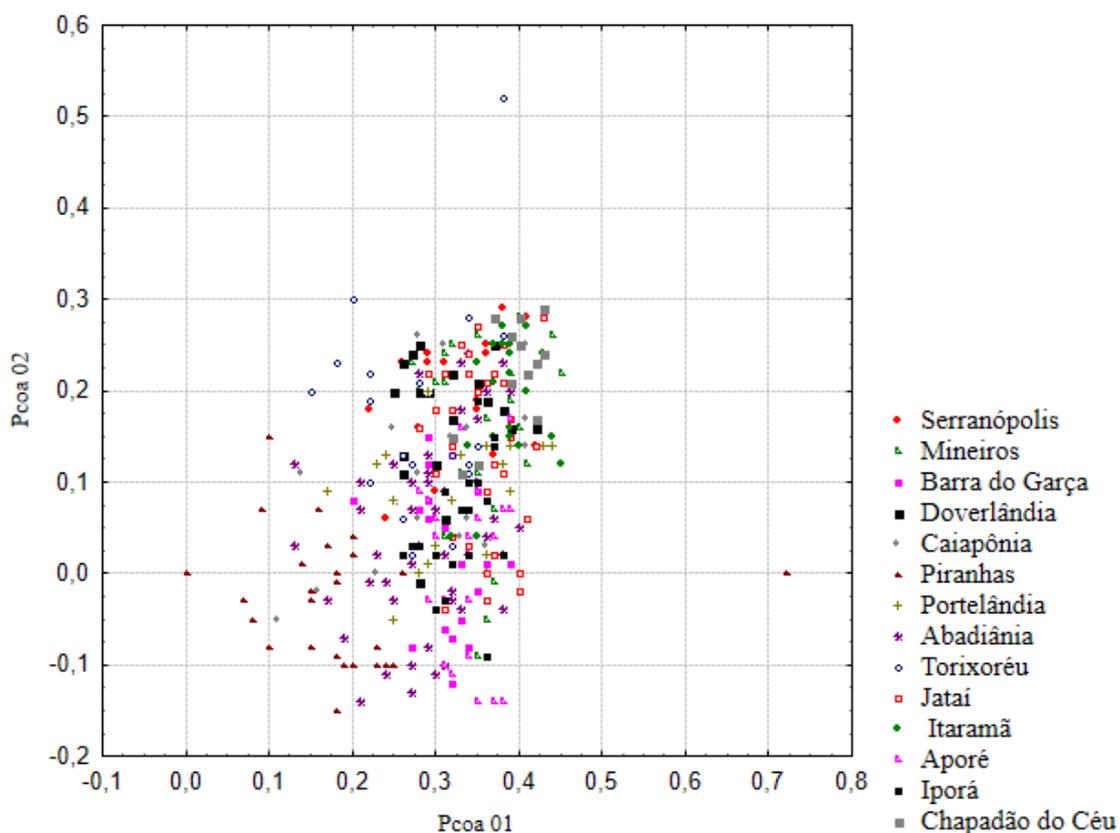


Figura 06. Dispersão gráfica dos 333 genótipos de *A. humile* St. Hill obtido pelo método de análise das Coordenadas Principais (PCoA) nos dois primeiros eixos.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo confirma a utilidade dos marcadores SSR na detecção de polimorfismo entre genótipos e populações da coleção de *Anacardium humile* St. Hill.

As quatorze populações estudadas apresentam moderados índices de estruturação genética.

Há endogamia significativa dentro das populações de *A. humile* St. Hill, indicando a ocorrência de acasalamento entre indivíduos aparentados.

Maior diversidade genética é observada dentro do que entre as populações estudadas.

Há historicamente um fluxo gênico significativo entre as populações estudadas.

Não foi encontrada correlação entre Distância genética geográfica.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estrutura genética das 14 populações naturais de *A. humile* St. Hill demonstrou que, de forma geral, as frequências alélicas foram similares entre populações, e a maior parte da variação total foi verificada dentro delas. O estudo aponta para uma moderada diversidade genética encontrada entre as populações podendo ser explicada pelos altos níveis de fluxo gênico. No entanto, tal fato pode estar relacionado ao curto período de tempo decorrido da fragmentação local da população original e, talvez, os reflexos ainda não ocorreram para que as divergências fossem detectadas estatisticamente entre as populações. Dessa forma, o estudo aponta que estratégias visando a conservação da diversidade genética da espécie implicam na manutenção de populações com grande número de indivíduos

Análises com uso de marcadores de DNA mitocondrial e uma abordagem filogeográfica com base em um raciocínio coalescente podem ser necessárias para melhor compreender as origens dos padrões observados, bem como a influência dos fluxos gênicos atuais e históricos.

A integração de métodos de abordagem, tanto genéticos como ecológicos, provavelmente nos permitirão compreender de maneira mais abrangente os processos a que populações naturais estão submetidas, tornando possível estabelecer estratégias mais eficientes para a preservação de uma infinidade de espécies.

Apesar de um crescente nível de conhecimento sobre a biodiversidade do Cerrado brasileiro, muitas lacunas precisam ser superadas para que as inúmeras pesquisas realizadas tenham uma maior influência nas ações de conservação.

8 REFERÊNCIAS

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

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A e BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira** p333-342, 2005.

AVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. Frutos dos cerrados: preservação gera muitos frutos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.3, n.15, p36-41, 2000.

AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. **Conservation genetics, case histories from nature**. Chapman e Hall, New York. 1996.

AVISE, J. C.; **Perspective: conservation genetics enters the genomics**. *Conservation Genetics*, v. 11, p665 – 669, 2010.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**. 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R. Melhoramento genético do cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P.; SILVA V. V. (Ed.). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT. p73-93, 1995.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2ª ed. Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa. v.1. 2002.

BATISTA, C. E. A. **Diversidade genética molecular em germoplasma de mangueira**. 2013. 103p. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

BIZERRIL, M. X. A. O Cerrado nos livros didáticos de geografia e ciências. **Ciência Hoje**, v. 32, n. 192, p56-60, 2003.

BLANCO, A. J. V.; PEREIRA, M. de F.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J. Diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) por meio da análise de sequências de CpDNA. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia: UFG. v. 37, n. 3, p169-175, 2007.

BORBA, E. L.; FUNCH, R. R.; RIBEIRO, P. L.; SILVA-PEREIRA, C. E. V. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. **Plant Systematics and Evolution** p129-146, 2007.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2 ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

BRASIL. **Cerrado e Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação da biodiversidade**. Brasília: MMA (Biodiversidade, 17), 2007.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente (MMA)**. Ações prioritárias para conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal. Brasília: MMA, Funatura CI, Fundação Biodiversitas, UnB, 1999.

BROWN, A. H. D.; WEIR, B. S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part A. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**. p73-86, 1983.

BURITY, V.; FRANCESCHINI, T.; VALENTE, F.; RECINE, E.; LEÃO, M. CARVALHO, M. F. C. **Direito humano à alimentação adequada no contexto da segurança alimentar e nutricional**. Brasília, DF: 204p, 2010.

BUSSAB, W. de O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 105p, 1990.

CABALLERO, I.; OLANO, J. M.; ESCUDERO, A.; LOIDI, J. 2008. Seed bank spatial structure in semi-arid environments: beyond the patch-bare area dichotomy. **Plant Ecology**, v. 195, p215-223.

CAETANO, S. et al. Identification of microsatellite markers in a neotropical seasonally dry Forest tree, *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.21-23, 2005.

CARVALHO, R. S.; PINTO, J. F. N.; REIS, E. F.; SANTOS, S. C.; DIAS, L. A. S.; Variabilidade genética de cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile* St. Hill) por meio de marcadores rapd. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal, vol. 34 n.1, 2012.

CAVERS, S.; DEGEN, B.; CARON, H.; LEMES, M.R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A.J. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**. v.95, p281-289, 2005.

CEMIG. **Companhia Energética de Minas Gerais. Assessoria de coordenação ambiental**. Guia ilustrativo de plantas do cerrado de Minas Gerais. Nobel, São Paulo, 2001.

CONTE, R.; REIS, M. S.; VENCOVSKY, R. Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.72, p81-88, 2006.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984.

CROW, J. F. e AOKI, K. **Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision.** Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of América. p607-677, 1984.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa: UFV, 442p, 2006.

DALPONTE, J. C. e LIMA, E. S. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora-Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica.** p325-332, 1999.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SCARIOT, S.; BENIN, G. Genetic Dissimilarity Among Jaboticaba Trees Native to Southwestern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v.33, p517-525, 2011.

DANTAS, A. C. A.; NUNES, G. H. S.; ARAÚJO, S. I.; ALBUQUERQUE, L. B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v.34, n.1, p183-189, 2012.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. de C.; BONATTO, S. L.; EIZIRIK E.; FREITAS, T. R. O. de; MARCO, P. de; SANTOS, F. R.; SOLE-CAVA, A.; SOARES, T. N. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. **Journal of Biogeography,** v.35, p753-763, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin,** v. 19, n. 1, p11-15, 1987.

ELLEGREN, H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. **Nature Genetics.** p400-402, 2000.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics,** v. 5, p435-445, 2004.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity,** London, v.72, p250-259, 1994.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHENEIDER, S. ARLEQUIN. 3.01: **An integrated software package for population genetics data analysis.** Disponível em: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. 2006. (acessado em 20/08/2014).

FALEIRO, F. G. **Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal.** In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de.; REIS JÚNIOR, F. B.; (Org.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, p55-118, 2011,.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Embrapa Cerrados, Planaltina-DF. 102p, 2007.

FENSTER, C. B.; VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). **Evolution**, v.57, p995-1007, 2003.

FERNANDES, R. C. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no norte de Minas Gerais**. 2008. 65p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras. Lavras.

FERRÃO, J. E. M. **O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)**. Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, 1995.

FERREIRA, F. R.; Germoplasma de frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, Volume Especial. p01-06, 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. EMBRAPA/CENARGEN, Brasília, 220p, 1998.

FILHO, J. A. D.; RESENDE, L. V.; BASTOS, G. Q.; NETO, D. E. S.; MACHADO, P. R. Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudos da variabilidade genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.1, p141-149, 2013.

FISCHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**. v. 87. p1128-1137, 2000.

FRANZON, R.C. **Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. 2008. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas.

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Sociedade Brasileira de genética - SBG, Ribeirão Preto, 631p, 1992.

GODINHO, T. F. Análise genética de matrizes de *Caryocar brasiliense* utilizando marcadores moleculares microssatélites. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal). 43p. 2013, Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha, Diamantina.

GOEDERT, C. O. **Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil**. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa, p 23-60, 2007.

GOIS, I. B. Variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis*, por meio de marcadores moleculares. 2010. 113p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

GOUDET, J. FSTAT (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. **Journal Heredity**, v.86, p485-486, 2002.

GUERRA, P. M.; NODARI, R. O Biodiversidade: aspectos biológicos geográficos, legais e éticos. In **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Org. Claudia Maria Oliveira Simões et. al. 5 ed. revisada e ampliada- Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRHS/Editora da UFSC, 2003.

HABER, L. L. **Characterization of the genetic diversity by microsatellite markers and compounds of the essential oil of *Lychnophora pinaster* Mart.** 2007. 112p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

HARDY, O. J.; CHARBONNEL, N.; FRÉVILLE, H.; HEUERTZ, M. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. **Genetics**, Baltimore, v. 163, p1467-1482, 2003.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2010.

HEYWOOD, J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.22, p.335-355, 1991.

HOEHNE, F. C. **Enumeração das principais espécies de fruteiras indígenas, pela ordem alfabética de suas famílias**. In Frutas indígenas (F. C. Hoehne, ed.). Instituto de Botânica, São Paulo, p13-79, 1979.

HOPKIN, M. **Brazilian savannah "will disappear by 2030"**. *Natura*, 2004. doi: 10.1038/news04719-6. Disponível em: <http://www.natura.com/news/2004/040720/full/news040719.html>. Acesso em: 18 ago 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Bioma Cerrado**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 22 maio de 2014.

JEPSON, W. A disappearing biome?: reconsidering land-cover change in the Brazilian savanna. **The Geographical Journal**. v. 171, n. 2, p99-111, 2005.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies tropicais de diferentes por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, p93-107, 2003.

KLINK, C. A.; A. G. MOREIRA. **Past and current human occupation and land-use**. In: P. S. Oliveira e R. J. Marquis (eds.). **The Cerrado of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna**. Columbia University Press, New York. p69-88, 2002.

KLINK, C. A; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**. Vol. 1, n.1, 2005.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data (software) version 1.1(d12)**, 2002. Disponível em: <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>.

LONDE, L. N., **Indução de respostas morfogenéticas em *Anacardium humile* St. Hill (Anacardiaceae) e análise da divergência genética entre populações.** 2005. 140p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional.** 6 ed. Plantarum. Nova Odessa. 269p, 2006.

LOVELESS, M. D. e HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics** 15:65-95. 1984.

LUIZ-FERREIRA, A.; COLA-MIRANDA, M. BARBASTEFANO, V. HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. **Should *Anacardium humile* St. Hill be used as an antiulcer agent?** Fitoterapia. p207-209, 2008.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A., SANTOS, N. S., TABOR, K. e STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro.** Conservation International. Brasília-DF, 2004.

MAIA, J. G. S.; ZOHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; LUZ, A. I. R.; BASTOS, C. N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal.** p269-272, 1998.

MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research.** p209-220, 1967.

MARTINS, P. S. ESTRUTURA POPULACIONAL, FLUXO GÊNICO E CONSERVAÇÃO "*in situ*". **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais.** Departamento de Genética. ESALQ-USP. n.35, p71-78,1987.

MELO, B.; MORAIS, P. T. Biologia molecular aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p753-760, 2011.

MELO, L. Q.; CIAMPI, A. Y.; VIEIRA, R. F. Análise da variabilidade genética de arnica (*Lychnophora ericoides* Less. - Asteraceae) usando marcadores RAPDs. *Acta bot. bras.* p259-266, 2009.

MELO, M. F. V. **Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd.** 2010. 38p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

MMM- **Ministério do Meio Ambiente.** Portaria n. 09, 23 janeiro 2007.

MOJENA R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal.** p359-363, 1977.

MOREIRA, J. A. N.; SANTOS, J. W. dos; OLIVEIRA, S. R. M. **Abordagens e metodologias para a avaliação de germoplasma**. Campina Grande: Embrapa-CNPA. 115p, 1994.

MOURA, T. M. **Estrutura genética em lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill, Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás. 2007**. 98p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA G. C. X ; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum spp.* do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Forestalis** (IPEF), v. 37, p143-150, 2009.

MYERS, N. R. A.; MITTERMEIER, C. G.; MITTERMEIER, G. A. B.; e KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. p853-845, 2000.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics** p583-590. 1978.

NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**. v.106, p283-292, 1972.

NEI, M. **Molecular populations genetics and evolution**. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 288p, 1975..

NEPSTAD, D. C.; STICKLER, C. M.; SOARES FILHO, B. S e MERRY, F. Interactions among Amazon land use, forests and climate: Prospects for a near-term forest tipping point. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. p1737–46, 2008.

NEWTON, A. C.; ALLNUTT, T. R.; GILLIES, A. C. M.; LOWE, A. J. e ENNOS, R. A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**. p140-145, 1999.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I. VENCOVSKY, R. e VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**. p294-307, 2006.

OLIVEIRA, M. do S.P de; AMORIM, E. P; SANTOS, J. B. dos; FERREIRA, D. F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras, v. 31, n. 6, p1645-1653, 2007.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J. V.; CIAMPI, A. Y.; COELHO, A. S. G. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p1329–1331, 2008.

PIRATELLI, A. J., SOUSA, S. D., CORRÊA, J. S., ANDRADE, V. A., RIBEIRO, R. Y., AVELAR, L. H. e OLIVEIRA, E. F. Searching for bioindicators of forest

fragmentation: passerine birds in the Atlantic forest of southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. p259-268, 2008.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: Editora dos autores. 328p, 2001.

REDE DE SEMENTES DO CERRADO. **Rede de sementes do Cerrado: *Anacardium humile* St. Hill.** Disponível em: <<http://www.sementesdocerrado.bio.br>>. Acesso em: 18 jun. 2013.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma do Cerrado: os biomas do Brasil. In: **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA, Planaltina, DF, p89-116, 1998.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos Cerrados**. Lavras: UFLA, 2001.

ROJAS, S.; YUYAMA, K.; CLEMENT, C. H.; NAGAO, E. O. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dúbia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria**. p51-64, 2011.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. **Mapeamento de Cobertura Vegetal do Bioma Cerrado: estratégias e resultados**. Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, p1517-5111, 2007.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C.; DRUMOND, M. A. Estimativas de polinização cruzada em população de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) usando marcador AFLP. **Revista Árvore** vol.35 N.3 supl.1 Viçosa, 2011.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 2, p211-215, 1992.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Scientia Forestalis**, v. 57, p123-139, 2000.

SHIMOYA, A.; CRUZ, C.D.; FERREIRA, R. de P.; PEREIRA, A.V.; CARNEIRO, P. C. S. Divergência genética entre acessos de um banco de germoplasma de capim-elefante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p 971-980, 2002.

SILVA, C. J. **Caracterização genética de cajazeiras (*Spondias mombin* L) (Anacardiaceae) por meio de marcadores moleculares**. 2009. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Programa de Pós Graduação em Agronomia "Melhoramento Genético de Plantas", Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

SILVA, D. B. da; SILVA, J. A. da; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. de. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 179p, 2001.

SILVA, E. F. DA.; OLIVEIRA, V. R.; MARTINS, L. S. S.; NASCIMENTO, W. F. DO. **Diversidade Genética em populações de Cajazeira (*Spondiaas mombin* L.) no Estado de Pernambuco**. In: Simposio Brasileiro sobre umbú, cajá e espécies afins, 50., 2008, Recife, Brasil. Embrapa, IPA e UFRPE, 2008.

SILVA, J. G DA; SOUZA, I. A; HIGINO, J. S; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P; PEREIRA, J. V; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p572-577, 2007.

SILVA, M. C. **Diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética espacial e fluxo gênico em *Tabebuia aurea***. 2010. 162p. Tese (doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SLATKIN, M. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. **Science**, Washington D. C., v. 236, 1987.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p393-430, 1985.

SLATKIN, M.; BARTON, N. H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, p1349-1368, 1989.

SOARES, T. N. **Estrutura genética populacional e fluxo gênico em *Dipteryx alata Vogel* (Fabaceae) no Cerrado**. 2008. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SOARES, T. N.; SANT'ANA, L. L.; DE OLIVEIRA, L. K.; TELLES, M. P. C.; COLLEVATTI, R. G. Transferability and characterization of microsatellite loci in *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research** p3146-3149, 2013.

SOARES, T. N; CHAVES, L. J. C; TELLES, M. P. C; DINIZ-FILHO, J. A. F E RESENDE, L. V. Distribuição espacial da variabilidade genética intrapopulacional de *Dipteryx alata*. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v.43, n.9, p1151-1158, 2008.

VÄLI, U.; EINARSSON, A.; WAITS, L.; ELLEGREN, H. To what extent do Microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? **Molecular Ecology**, p3808-3817, 2008.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Editor técnico). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p.281-305, 2007.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. Conservação "ex situ" de recursos genéticos vegetais. In: Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S.; Valadares-Ingliš, M. C. (ed.): **Recursos Genéticos e Melhoramento** - Planta. Rondonópolis: Fundação MT, p123-158, 2001.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant population. **Molecular Ecology**, v.13, p921-935, 2004.

VENCOVSKY, R. **Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size**. In: International Workshop on Agricultural Biotechnology. Proceedings. ESALQ-USP, Piracicaba, Cook College - New Jersey Agricultural Experiment Station, The State University of New Jersey, Rutgers. 1997.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, v.43, p1912-1921, 2003.

VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAMANATHA, R. V. Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: The role of biotechnology. **Proceedings**, p121-128, 2005.

VIEIRA, R. A.; SOUZA NETO, I. L.; BIGNOTTO, L. S.; CRUZ, C. D.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; SCAPIM, C. A. Heterotic parametrization for economically important traits in popcorn. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p411-419, 2009.

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; CANEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p64-66, 2003.

WEILER, R. L.; BRUGNARA, E.C.; SCHWARZ, S. F.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M. A.; WITTMANN, M. T. S. Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira "Clementina Fina" "Montenegrina". **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.7, p1523-1529, 2010.

WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics Bulletin**, Washington, v.35, n.1, p235-254, 1979.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 377p, 1996.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p1358-1370, 1984.

WILLIS, E. O. The composition of avian communities in remanescent woodlots in southern Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 33, n. 1, p1-25, 1979.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, p97-159, 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugenics** (United Kingdom). p323-354. 1951.

ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. A.; MELLO JÚNIOR, J. R. S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia forestalis**, n. 65, p114-119, 2004.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; AGUIAR, A. V.; CHAVES, L.; GUEDES, J.; COELHO, A. S.; VENCOVSKY, R. Padrão espacial de divergência em populações de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores microssatélites. **Floresta e Ambiente**. p29-38, 2004.

ZUCCHI, M.; BRONDANI R.V.; PINHEIRO J.B.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p449-457, 2003.