

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA  
PARA A AMAZÔNIA - CITA**

Sistema Reprodutivo e Diversidade Genética de *Bertholletia excelsa* em  
diferentes ambientes no Estado do Acre

**Vanessa Santos Silva**

**RIO BRANCO**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E  
PÓS-GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A  
AMAZÔNIA**



Sistema Reprodutivo e Diversidade Genética de *Bertholletia excelsa* em  
diferentes ambientes no Estado do Acre

Vanessa Santos Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.

Área de Concentração: Ciência e Inovação Tecnológica

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lúcia Helena de Oliveira Wadt

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Tatiana de Campos

Rio Branco – Acre

Março 2014

©SILVA, V. S., 2014.

SILVA, Vanessa Santos. **Sistema reprodutivo e diversidade genética de *Bertholletia excelsa* em diferentes ambientes no Estado do Acre**. Rio Branco, 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e tecnologia para a Amazônia) – Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e tecnologia para a Amazônia. Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A**  
**AMAZÔNIA**

Vanessa Santos Silva

SISTEMA REPRODUTIVO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Bertholletia excelsa* EM DIFERENTES AMBIENTES NO ESTADO DO ACRE

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:

---

Dr<sup>a</sup>. Lúcia Helena de Oliveira Wadt (Orientadora)  
EmbrapaAcre

---

Dr<sup>a</sup>. Giselle Mariano Lessa de Assis  
Embrapa Acre

---

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maria Drumond  
Embrapa Acre

---

Prof. Dr. Antônio Gilson Gomes Mesquita  
Universidade Federal do Acre - UFAC  
(suplente)

Aos meus pais  
Marcos Antonio da Silva e  
Márcia Maria dos Santos da Silva  
OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda a força e sabedoria a mim concedida;

À pesquisadora, amiga e orientadora Dr<sup>a</sup>. Lúcia Helena de Oliveira Wadt por todo o ensinamento e confiança passados a mim, não só no curso de mestrado, mas em toda a minha vida profissional até o momento;

À amiga e co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Tatiana de Campos que esteve presente em todos os momentos do mestrado, principalmente na parte final, me ensinando, ajudando e aconselhando;

À pesquisadora e amiga Dr<sup>a</sup>. Karina Martins que sempre esteve presente, pois foi com ela que aprendi a maioria do que sei no laboratório e pela ajuda nas análises estatísticas;

Sem as três pesquisadoras citadas acima, que Deus colocou em minha vida, tenho certeza que não teria chegado onde estou agora!

À Universidade Federal do Acre, em especial a Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia que me deram a oportunidade de especialização profissional;

Aos professores do mestrado por todos os ensinamentos transmitidos;

Aos funcionários da Embrapa Acre Charles, Felismino, Josivaldo, Robert e Fernanda Fonseca pelo apoio e ajuda na elaboração do meu experimento;

Ao Daniel Papa e ao Alisson que tornaram meu trabalho mais bonito com todos os mapas;

Aos meus queridos Aldeci, Paulo Carvalho, Manoel Freire, Zé Ricardo e Airton pela ajuda na coleta de material para o estudo. Esses, com certeza, tornaram meu trabalho de campo mais divertido!

À amiga Dr<sup>a</sup> Andréa Raposo pelas conversas, ensinamentos e experiências passadas estando presente sempre nos momentos certos;

Aos meus colegas da pós-graduação Ezaquiel, Hellen, Janaína, João Ricardo, Sabrina e Andréa pela amizade e união durante todo o curso;

Aos meus queridos amigos do laboratório Jaire Alves, Márcia Oliveira, Renata Beltrão e Josy Assunção por todo o tempo que passaram comigo no laboratório tendo paciência com meus dias de estresse, me apoiando nos momentos de cansaço e me ajudando sempre que precisei;

Às minhas queridas amigas Lilian, Raifanny e Susana, minhas “irmãs de orientadora”, que não estiveram comigo no período do mestrado, porém, sempre compartilharam suas experiências na caminhada profissional servindo de exemplo e me dando força para a conclusão do trabalho;

À minha família toda- pais, irmão, tios, primos, minha afilhadinha Maria e a todos os meus amigos- pela compreensão da minha ausência em alguns momentos devido aos estudos;  
À coordenadoria de aperfeiçoamento e Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

**OBRIGADA!!!**

## RESUMO

Esse estudo investigou diferenças na diversidade genética, taxa de cruzamento e fluxo gênico com análise de paternidade para *Bertholletia excelsa* em três ambientes: floresta nativa, pastagem e plantio. Para isso foram analisados nove locos microssatélites em castanheiras adultas estabelecidas em cada população e progênies formadas por sementes coletadas em matrizes. Foi encontrada alta diversidade genética nas três populações de adultos sendo que nas progênies observou-se perda de diversidade. Nas populações de adultos, o pasto foi o único ambiente em que se observou excesso de heterozigotos, enquanto que para as progênies todos os ambientes estiveram com excesso de heterozigotos, talvez devido ao cruzamento entre parentes. Na análise de taxa de cruzamento, as três populações confirmaram a alogamia para a espécie, inclusive com totalidade de cruzamentos no pasto e no plantio. Houve cruzamento entre indivíduos aparentados para todos os ambientes e também correlação de paternidade, sugerindo a ocorrência de cruzamentos preferenciais com formação de irmãos completos na mesma família, especialmente na floresta. Em todos os ambientes foram encontrados possíveis doadores de pólen, porém houve uma grande proporção das progênies que não tiveram seus doadores de pólen identificados, demonstrando altas taxas de imigração de pólen e grandes distâncias de fluxo gênico. Os resultados obtidos neste estudo sugerem cruzamentos não aleatórios em populações naturais, mas também a existência de mecanismos que evitam a endogamia nas populações estabelecidas; indicam ainda que os remanescentes de castanheiras nas pastagens sofrem efeito de deriva genética e portanto, não constitui uma boa estratégia de conservação para a espécie. Análise de coleção nuclear indicou que cerca de 30 indivíduos em castanhal nativo podem representar toda a variabilidade genética da população.

Palavras-chave: *Bertholletia excelsa*; taxa de cruzamento; fluxo gênico; microssatélites.

## ABSTRACT

This study investigated differences in genetic diversity, outcrossing rate and gene flow with paternity analysis to *Bertholletia excelsa* in three environments: native forest, pasture and planting. Nine microsatellite loci were analyzed in Brazil nut trees established in each population and progenies obtained from seeds collected in matrices of each population. High genetic diversity was found in all adults populations but loss of diversity was observed in the progenies. In adult populations, was observed only for pasture excess of heterozygotes, while for the progenies were all environments with excess heterozygotes, perhaps due to mating among relatives. The results confirmed allogamy for the species, including full crossing in the pasture and planting. There was mating among relatives to all environments and paternity correlation, suggesting a preferred crossing with full sibling in the family, especially in the forest. In all environments possible pollen donors were found, but there was a large proportion of progeny that did not have their pollen donors identified, showing high rates of immigration and great distances of gene flow. The finds suggest not random mating in natural populations, but also the existence of mechanisms to avoid inbreeding within established populations; further indicate that the remnants of brazil nut trees in pastures suffer some genetic drift effect, and therefore it is not a good conservation strategy for this species. Core collection analysis indicated that about 30 individuals in Brazil nut stand may represent the genetic variability of the population.

**Key-words:** *Bertholletia excelsa*, outcrossing rate, gene flow, microsatellite.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	<i>Bertholletia excelsa</i> (Foto: acervo do projeto Kamukaia).....	3
Figura 2-	Flores (a) e frutos (b) de castanheira (Fotos: Vanessa Santos).....	4
Figura 3-	Abelha do gênero <i>Bombus</i> e a cotia ( <i>Dasyprocta aguti</i> ), representantes dos polinizadores e de dispersores de sementes, respectivamente (Fotos: (a)Marcelo Casemiro; (b) Acervo do projeto Kamukaia).....	4
Figura 4-	Local dos estudos indentificando as populações analisadas e a distância entre as mesmas.....	15
Figura 5 -	Número de indivíduos representando a coleção nuclear de <i>B. excelsa</i> no seringal Filipinas.....	24
Figura 6-	Frequência de alelos exclusivos classificados em raro (< 1%), intermediário (entre 1 e 10%) e frequente (> 10%), em cada população estudada de <i>Bertholletia</i> .....	25
Figura 7-	Gráfico de delta (K) com K=3, realizado pelo programa STRUCTURE através do modelo de Evanno et al. (2005) para os indivíduos adultos das três populações.....	26
Figura 8-	Esquema em imagem de satélite mostrando a posição geográfica das árvores, as direções e distâncias de migração de pólen em <i>Bertholletia excelsa</i> , nas populações de floresta nativa, plantio e pastagem.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tamanho amostral para os estudos de diversidade genética e taxa de cruzamento, em cada ambiente de estudo.....	16
Tabela 2 -	Número de genótipos considerados nas análises genéticas.....	17
Tabela 3-	Caracterização dos locos quanto ao número de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e número de alelos efetivos ( $\hat{A}_e$ ) ; heterozigozidade esperada ( $\hat{H}_e$ ) e heterozigozidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e índice de fixação ( $\hat{f}$ ) para os adultos e as progênies nos três ambientes analisados.....	22
Tabela 4 -	Estatística $F$ para os adultos e progênies dos três ambientes.....	25
Tabela 5 -	Parâmetros de taxa de cruzamento para <i>Bertholletia excelsa</i> .....	27
Tabela 6 -	Média da estimativa de migração de pólen dentro das famílias em cada ambiente amostrado onde a taxa de pólen está expressa.....	29

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Espécie estudada.....	3
2.1.1 Trabalhos Moleculares com <i>Bertholletia excelsa</i> .....	4
2.2 Estrutura Genética de Populações.....	7
2.3 Sistema de Reprodução.....	8
2.4 Fluxo Gênico.....	10
2.5 Marcadores Genéticos.....	13
2.5.1 Microssatélites.....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Locais de Estudo.....	15
3.2 Coleta de Dados.....	16
3.3 Extrações de DNA e Amplificação com os microssatélites.....	16
3.4 Análises Estatísticas.....	18
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
4.1 Diversidade genética nos três ambientes.....	21
4.2 Taxa de Cruzamento.....	26
4.3 Fluxo Gênico e análise de paternidade.....	29
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>32</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A castanheira (*Bertholletia excelsa*) é uma árvore símbolo da região amazônica devido a sua importância social, econômica e ecológica (WADT, 2009), pois fornece um dos principais produtos do extrativismo florestal, a castanha-do-brasil (KAINER et al., 2007; SHANLEY; MEDINA, 2005; ZUDEIMA, 2003). Esta castanha é colhida nas florestas naturais (MORI; PRANCE, 1990) e dessa forma, a atividade de extração está relacionada com a conservação das florestas tropicais. A venda desta castanha tem sido uma importante fonte de renda para os coletores e processadores de áreas rurais e periurbanas (STOIAN, 2005) e, ainda, trata-se da única noz comercializada internacionalmente cuja coleta é feita em áreas de florestas naturais (SANTOS et al., 2010).

*Bertholletia excelsa* é uma planta alógama com síndrome de polinização melitófila. Suas flores possuem uma morfologia que restringe a entrada de insetos visitantes fazendo com que os polinizadores precisem apresentar vigor físico e tamanho corporal compatível com a estrutura da flor. Os principais visitantes e polinizadores da castanheira são as abelhas dos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Xylocopa* e *Epicharis*, assim como algumas espécies de *Euglossinae* (MÜLLER et al., 1980; MORITZ, 1984; MAUÉS, 2004; ARGOLO; WADT, 2003, CAVALCANTE et al., 2012). Estudos remotos (MORITZ, 1984; MORITZ; LUDDERS, 1993a, 1993b) indicam a ocorrência de heterostilia, em que foram observadas flores com estilete de dois tamanhos em uma mesma planta, e também autoincompatibilidade e incompatibilidade entre os clones existentes no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. No entanto, poucos são os estudos recentes sobre biologia floral e polinização da castanheira (CAVALCANTE, 2008; 2013; CAVALCANTE et al., 2012) e ainda existem muitos pontos a serem esclarecidos quanto a esses aspectos.

A floração de *B. excelsa* ocorre no período inicial das chuvas em que há oferta abundante de néctar e pólen para os visitantes (MORITZ, 1984; MAUÉS, 2002). Apesar da floração abundante e alta sincronia de floração entre as árvores (TONINI, 2011), estudos preliminares relatam que a relação flor:fruto em áreas plantadas é muito baixa, variando entre 0,28 e 0,40% (PINHEIRO; ALBUQUERQUE, 1968). Como o vingamento de frutos pode variar de acordo com a maior ou menor atividade de polinizadores naturais (LIMA citado por PINHEIRO; ALBUQUERQUE, 1968), os agentes de polinização podem ter um papel fundamental na produção de frutos de castanha-do-brasil.

Segundo Kremen et al. (2007) grandes áreas de plantios puros podem afetar a eficiência dos polinizadores. Em um amplo plantio de castanheiras em Itacoatiara-AM, Cavalcante (2008) verificou variação na riqueza, diversidade e abundância de abelhas visitantes em *B. excelsa* à medida que a florada progrediu, sugerindo uma dispersão dos polinizadores entre as plantas e um déficit de polinizadores.

Apesar dos estudos de Cavalcante (2008; 2013) sobre eficiência dos polinizadores em plantios de castanheiras, ainda não se sabe muito sobre os mecanismos que podem favorecer ou não a polinização desta espécie seja em floresta natural ou em plantios. Além disso, existe o mito de que castanheiras remanescentes em pastagens seriam árvores sem funcionalidade reprodutiva (*living-dead trees*), pois acredita-se que os polinizadores não são capazes de voar grandes distâncias abertas para promover a polinização cruzada necessária à formação dos frutos. Apesar desta informação não estar publicada de forma clássica é possível encontrar na internet opiniões a respeito deste assunto.

Apenas dois estudos estão disponíveis na literatura sobre taxa de cruzamento da castanheira. O'Malley et al. (1988), apresentaram a primeira estimativa de taxa de cruzamento para *Bertholletia excelsa*, com base em marcadores isoenzimáticos, progênies de castanheiras coletadas no Estado do Acre. Neste estudo a estimativa de cruzamento foi de 0,85, porém as condições do estudo não permitem uma comparação direta com resultados mais recentes (PARDO, 2001 e este estudo), pois foram analisados apenas dois locos e a estimativa foi obtida por teste de Qui-Quadrado comparando as frequências gênicas de óvulo e pólen. Atualmente existe uma estatística apropriada para calcular e testar a estimativa da taxa de cruzamento desenvolvida por RITLAND (2002). Pardo (2001) também avaliou, por isoenzimas, a taxa de cruzamento em três populações de castanheiras (uma em floresta natural e duas em pastagem), encontrando uma estimativa (usando cálculo de RITLAND, 1997) da taxa de cruzamento multilocus ( $\hat{t}_m$ ) que variou de 0,927 a 1,0. Este resultado foi um pouco diferente do apresentado por O'Malley et al. (1988), sendo feitas as ressalvas citadas acima sobre diferenças na metodologia. Esses resultados indicaram predominância de fecundação cruzada e quase nenhuma diferença entre ambientes.

Nenhum estudo foi realizado sobre fluxo gênico e paternidade em populações de *Bertholletia excelsa*, portanto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de se avaliar a diversidade genética, o sistema de cruzamento, o fluxo gênico e análise de paternidade da castanheira em três ambientes: floresta, pasto e plantio no Estado do Acre.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Espécie estudada

*Bertholletia excelsa*, pertencente à família Lecythidaceae, conhecida popularmente como castanheira-do-brasil ou castanheira-do-pará é uma espécie arbórea de terra firme que ocorre em toda a região amazônica, incluindo os estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima, o norte dos estados de Mato Grosso e Goiás e os países Peru, Bolívia, Colômbia, Venezuela e as Guianas (TONINI, 2011) (Figura 1). Pode estar dispersa em castanhais com uma alta densidade de árvore por hectare (ORTIZ, 2002) ou pode ser encontrada em grandes áreas com baixa densidade (WADT et al., 2005).



Figura 1- *Bertholletia excelsa* (Foto: acervo do projeto Kamukaia)

A espécie possui flores femininas e masculinas na mesma planta (monóica), sua reprodução ocorre por cruzamentos e estudos mostram que possui um mecanismo de autoincompatibilidade (O'MALLEY, 1988; CAVALCANTE, 2008). As flores possuem seis pétalas, de cores que variam do branco ao amarelo, sendo que uma dessas pétalas recobre os estames e o estigma chamado de lígula, que dificulta a entrada de determinados visitantes fazendo uma seleção de polinizadores (MAUÉS, 2002) (Figura 2a). As flores ficam dispostas em inflorescências que amadurecem no período de Outubro a Janeiro (LIMA; WADT; MARTINS, 2007).

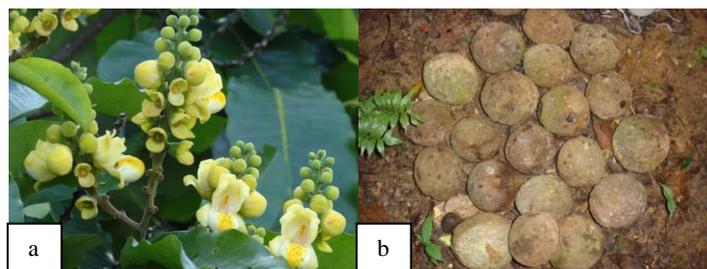


Figura 2- Flores (a) e frutos (b) de castanheira (Fotos: Vanessa Santos)

Apesar da presença de visitantes como as borboletas e pequenas abelhas, as flores da castanheira são polinizadas, principalmente, por abelhas de grande porte, robustas e de língua comprida da família Apidae, pertencentes aos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Epicharis*, *Eulaema* e *Xylocopa* (MAUÉS, 2002; ARGOLO; WADT, 2003; CAVALCANTE, 2008) (Figura 3a). Os frutos da castanheira são conhecidos como ouricós, os quais são lenhosos, esféricos, e contém de 8 a 26 sementes (KAINER et al., 2007) (Figura 2b). Após a frutificação, a cutia, a cutiara, a paca e o macaco são os principais dispersores de sementes (PERES; SCHIESARI; DIAS-LEME, 1997; ORTIZ, 2002; ZUDEIMA, 2003; SILVA, 2009; HAUGAASEN et al., 2010).

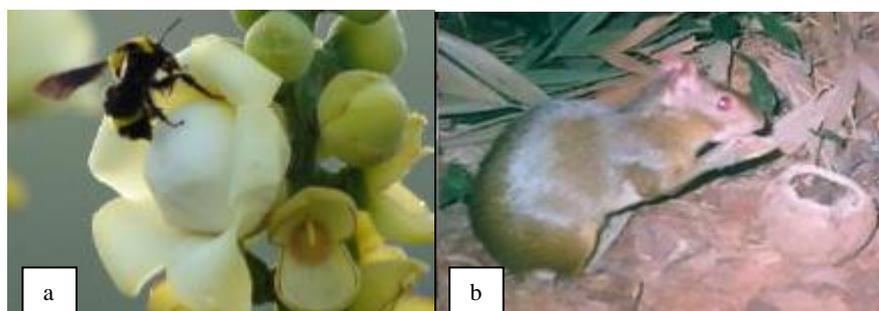


Figura 3 – Abelha do gênero *Bombus* e a cutia (*Dasyprocta aguti*), representantes dos polinizadores e de dispersores de sementes, respectivamente (Fotos: (a) Cavalcante, 2008; (b) Acervo do projeto Kamukaia).

O óleo extraído das sementes é muito utilizado na indústria de cosméticos e a casca do tronco pode ser usada como remédio. O ouriço é uma ótima matéria-prima para fazer carvão, mas é como alimento que a castanha tem maior utilidade e atinge seu maior valor econômico. (SHANLEY; MEDINA, 2005), constituindo uma importante fonte de renda para as famílias que vivem através de sua venda.

### 2.1.1 Trabalhos moleculares com *Bertholletia excelsa*

Ao longo dos anos, a espécie *Bertholletia excelsa* vem sendo estudada pelos mais variados tipos de marcadores moleculares. Buckley et al. (1988) forneceram a primeira

estimativa de diversidade genética entre duas populações, encontrando somente 3,75% de diversidade entre as populações, mostrando que a maior parte da variação estava dentro das populações. Os autores indicam que a alta variabilidade dentro das populações se deve ao sistema de acasalamento alógamo e também que a pouca diferenciação genética entre as populações pode ser uma evidência de que essas castanheiras tenham sido plantadas por índios, ou seja, apresentam um mesmo ancestral comum. Kanashiro et al. (1997) avaliaram a diversidade genética em cinco populações com RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) encontrando 68,7% da variação dentro e 31,3% entre as cinco populações (uma do Acre e quatro do Pará). Os resultados encontrados corroboram com os achados de Buckley et al. (1988) em que a maior diversidade encontra-se dentro da população. Os autores também sugeriram que as populações distantes geograficamente são próximas geneticamente de acordo com os dados de RAPD. Por outro lado, Pardo (2001) avaliou a divergência genética entre três populações, uma em área de floresta e duas em áreas de pastagens, no Estado do Acre, com dois e quatro anos de formação, encontrando valores muito baixos de divergência genética ( $\theta=0,020$  e  $0,027$ ). A autora também encontrou um baixo coeficiente de endogamia indicando que as populações apresentaram pouco parentesco entre os indivíduos, resultado que ocorre devido a alto-incompatibilidade apresentada pela espécie e também devido ao baixo fluxo gênico.

Serra et al. (2006) estudaram a divergência genética entre indivíduos de dois plantios de castanheiras estabelecidos em estados diferentes (Pará e Mato Grosso). Encontraram três grupos distintos, um com indivíduos dos dois estados e os outros dois com indivíduos de cada estado separado. Seus resultados mostraram que apesar de estarem distantes geograficamente, alguns indivíduos apresentaram similaridade, sugerindo a possibilidade das sementes plantadas em um local serem derivadas de outro, corroborando com a idéia de que a distribuição da castanheira é atribuída à intervenção do homem. Gribel et al. (2007) avaliaram, por meio de cpDNA e marcadores microssatélites, a dispersão e a estrutura genética de 116 castanheiras amplamente distribuídas em oito populações naturais da Amazônia. Os autores não encontraram nenhuma estruturação genética e 93% da variação genética foi encontrada dentro das populações. Os autores sugerem uma recente irradiação da espécie ao longo da Amazônia, considerando a dispersão por ameríndios, já que a dispersão por animais é de curta distância. Reátegui-Zirena et al. (2009) avaliaram a diversidade genética em populações do Peru utilizando marcadores microssatélites e encontraram resultados similares aos trabalhos anteriores, com a maior variabilidade presente dentro das

populações (98,06%) e mostrou que todas as localidades avaliadas apresentaram pouca diferenciação genética entre elas. Os autores atribuem os resultados ao fato de existirem poucas barreiras físicas entre as populações ao longo tempo de duração de vida das árvores, possibilitando um elevado fluxo gênico e ao sistema de reprodução alógamo da castanheira. Em outro estudo de estrutura genética, Oliveira (2011), encontrou baixa diversidade genética e constatou que a divergência genética entre as duas populações avaliadas foi menor entre os adultos do que os regenerantes de acordo com o autor, a fragmentação entre as populações ainda não foi suficiente para gerar estruturação genética.

Kageyama et al. (2004) analisaram a distribuição da diversidade genética em duas áreas com diferentes regimes de uso de terra com o uso de marcadores RAPD, encontrando 82% de polimorfismo com a maior parte do polimorfismo surgindo nas populações menos perturbadas. Shepard et al. (2011) fizeram um estudo multidisciplinar baseado em trabalhos que compararam *B. excelsa* com outras Lecythidaceas, tanto em aspectos ecológicos como genéticos. Em seus resultados os autores destacam que apesar da espécie ser descrita como mais próxima de algumas espécies do gênero *Lecythis*, ela continua sendo diferente ao ponto de não ocorrer hibridização. Também consideram a hipótese de que a dispersão das castanheiras foi por meio antrópico, mostrando que outras espécies do gênero *Lecythis* conferem uma recente colonização de *Bertholletia excelsa*. Os resultados apresentados pelos trabalhos de genética mostraram muita variabilidade dentro da espécie e pouca diferenciação entre as populações, já com dados de cpDNA, não foi encontrada nenhuma diversidade genética, sugerindo uma recente e rápida expansão da espécie. Sujii et al. (2013) avaliaram as diferenças genéticas presentes em castanheiras descritas por extrativistas como vermelha e branca, a partir de dados de RAPD e iSSR (*Inter Single Sequence Repeats*). Em seus resultados, os autores não mostraram nenhuma diferença significativa entre os tipos, indicando que essa não é uma detectável diferenciação molecular.

O'Malley et al. (1988) apresentaram as primeiras estimativas de taxa de cruzamento para a castanheira, mostrando que a espécie apresenta 85% de cruzamentos e possui um baixo índice de autofecundação (15%). Esses resultados estão de acordo com experimentos em que foi detectado que *B. excelsa* é predominante ou completamente auto-incompatível. O autor também explica que as altas taxas de cruzamento também podem estar relacionadas com a baixa densidade da espécie que é compensada por um mecanismo de dispersão conferindo o maior número de oportunidades de acasalamento com um grande número doadores de pólen. Pardo (2001) encontrou taxas de fecundação cruzada de 1,0 e 0,93, mostrando que a

castanheira apresenta um sistema de cruzamento alógamo e corroborando com o trabalho de O'Malley et al. (1988). Estudos de fluxo gênico e paternidade não estão disponíveis para *Bertholletia excelsa*.

## 2.2 Estrutura Genética de Populações

A estrutura genética de populações estuda as mudanças genéticas que ocorrem durante a evolução revelando os mecanismos que regem a transmissão do material herdável do genitor para seus descendentes ao longo das gerações (METTLER; GREGG, 1973). O objetivo desse tipo de estudo é quantificar a variação existente entre os indivíduos, o seu comportamento reprodutivo e os padrões de fluxo gênico. Também busca explicar os papéis dos mecanismos como seleção, fluxo gênico e deriva genética na diferenciação das populações, através de interações entre mecanismos ecológicos e evolutivos (MARTINS, 1987).

A diversidade genética de uma espécie é fundamental para garantir seu potencial adaptativo frente às desventuras ambientais. O estudo da variação genética em populações naturais considera tanto os níveis de variabilidade das populações como a caracterização da estrutura genética entre as populações (CONTE, 2004). Quantificar essa variabilidade dentro das populações é crucial para avaliar como as espécies enfrentam o ambiente e se mantêm vivas e reprodutivas ao longo dos tempos (RIBEIRO; RODRIGUES, 2010). Consequentemente, a manutenção urgente da variabilidade genética é fundamental para a sobrevivência de espécies ameaçadas de extinção (HOLSINGER; GOTTLIEB, 1991), pois ela promove a matéria prima para adaptação, evolução e sobrevivência das espécies e indivíduos, especialmente sobre mudanças ambientais e condições de doenças. Reduções na diversidade genética podem predispor as espécies a doenças, reduzir a produtividade e limitar o melhoramento genético (RAJORA; PLUHAR, 2003; BARREIRA et al., 2006).

Toda a informação genética contida na população denomina-se reservatório genético ou “*pool gênico*” que é reconstituído a cada geração (METTLER; GREGG, 1973). Existem diversos fatores que atuam na transmissão de genes de uma geração a outra, como as mutações, as migrações, a seleção e a deriva, sendo esses influenciados pelo tamanho da população, pelo sistema de acasalamento, pela distribuição geográfica e pelo fluxo de genes (HAMRICK, 1993).

Nas populações naturais de todos os organismos, a variação genética está presente de várias formas, sendo que as principais forças que atuam gerando esta variação são a mutação,

a seleção e deriva. Se a variação genética está presente dentro da população, muitas alterações por pressão seletiva devido a mudanças ambientais permitirão que alguns indivíduos sobrevivam e se reproduzam (LOWE; HARRYS; ASTHON, 2004). Portanto, a variação genética se torna um conceito fundamental na estrutura genética de uma espécie podendo ser apresentada de três formas: diversidade genética (a quantidade da variação genética existente na espécie), diferenciação ou variabilidade genética (a distribuição da variação entre as populações) e distância genética (a quantidade de variação genética entre os pares de população).

Existem várias formas de se avaliar a estrutura genética das populações, dentre elas está a distância genética de Nei (1973), que calcula a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações; o coeficiente de coancestralidade de Cockerham (1969), que fornece a distribuição da variabilidade genética em diferentes níveis hierárquicos e; as estatísticas  $F$  de Wright (1965), que fornecem os índices de fixação alélica para o total de populações ( $F_{it}$ ), dentro da população ( $F_{is}$ ) e a divergência entre as populações ( $F_{st}$ ). Apesar da importância destas estatísticas, elas permitem apenas uma descrição geral da heterogeneidade espacial da variabilidade existente (BARBUJANI, 1987).

### 2.3 Sistemas de Reprodução

O sistema de reprodução de uma espécie define a organização genética das populações, pois mostra como os gametas passam de geração a geração, controlando as frequências fenotípicas e diminuindo ou acelerando a quantidade de novas combinações gênicas e as já existentes (ALLARD, 1971). É de extrema importância devido à capacidade de mostrar os padrões de fluxo gênico, a diversidade entre e dentro das populações (BAWA, 1974), o tamanho efetivo de cada progênie (SEBBENN, 2006), além de fornecer informações sobre as melhores formas de manejo e conservação de espécies (OLIVEIRA et al., 2002).

Com um papel fundamental na composição genética das populações, o sistema de reprodução regula a distribuição da diversidade genética entre e dentro das progênies, das populações e das subdivisões de populações, mostrando o grau de parentesco entre os descendentes que compõem tais progênies (HAMRICK, 1987).

Segundo Gusson et al. (2005), os tipos de reprodução podem ser por cruzamentos aleatórios, cruzamentos biparentais, por autofecundação, por apomixia e suas combinações. Os cruzamentos biparentais podem ser chamados de cruzamentos correlacionados, onde

sementes da mesma matriz podem ser geradas pelos mesmos pais (RITLAND, 1989; HARDY et al., 2004). Esse tipo de cruzamento é frequentemente expresso pela proporção de irmãos-completos e é calculado através da correlação de paternidade (RITLAND, 1989). Geralmente esse tipo de cruzamento ocorre onde existem cruzamentos entre vizinhos próximos ou onde o número de doadores de pólen é baixo (SURLES et al., 1990).

Os sistemas de reprodução podem ser afetados por fatores externos e internos às plantas. Os fatores externos podem ser densidade das plantas (MURAWSKI; HAMRICK, 1991), o isolamento espacial das árvores (CASCANTE et al., 2002; FUCHS et al., 2003) e a atividade do polinizador (HIRAO et al., 2006). Já na parte interna da planta, fatores como variações na fenologia de florescimento, diferenças na maturidade reprodutiva das plantas com redução do tamanho da vizinhança reprodutiva e com alocação de recursos dentro dos frutos (MILLAR et al., 2000). A autoincompatibilidade, outro mecanismo interno de origem genética, também afeta o sistema de reprodução de plantas evitando autofecundações e cruzamentos endogâmicos (BAWA; O'MALLEY, 1985).

Esses fatores podem gerar variações na taxa de cruzamento e correlação de paternidade entre frutos dentro de plantas, entre plantas dentro de populações, entre populações e em eventos reprodutivos dentro da população entre as floradas de algumas árvores (SEBBENN, 2006). Fatores antropogênicos também podem afetar o sistema de cruzamento de espécies arbóreas (LACERDA et al., 2008).

A autoincompatibilidade, a protogenia e protandria, o aborto seletivo para a regulação da qualidade das sementes ou por rivalidade entre irmãos, a densidade de indivíduos e a fenologia de floração, que afetam o comportamento do polinizador e a taxa de cruzamento, são fatores determinantes para o sistema de reprodução de uma espécie (SHAANKER et al., 1988; MARSHALL; FOLSOM, 1991).

Em espécies arbóreas, ocorre geralmente um sistema misto de reprodução com predomínio de cruzamentos. Esses cruzamentos geralmente ocorrem entre indivíduos aparentados e de forma sistemática, com cruzamentos endogâmicos e biparentais (SEBBENN, 2001), gerando uma prole dividida em irmãos completos, meio-irmãos e irmãos de autofecundação (SEBBENN, 2002; 2003).

De uma forma geral, as espécies arbóreas apresentam uma baixa densidade populacional (BAWA, 1974), o que pode favorecer a autofecundação (MORAES; SEBBEN, 2011). A autofecundação é compensada pela grande quantidade de espécies dióicas, pelos

sistemas de autoincompatibilidade e pela depressão por endogamia (BAWA; O'MALLEY, 1985).

A variabilidade genética está intimamente ligada com a fecundação cruzada. Para as espécies que se reproduzem por cruzamento, a maior parte da variação genética se encontra dentro da população, enquanto que as espécies que fazem preferencialmente autofecundação mostram a maior parte da variação genética entre as populações (HAMRICK, 1983; HAMRICK; GODT, 1989). A presença de variabilidade genética também é bastante importante para que a espécie possa responder a mudanças ambientais no futuro e impedir que as populações cheguem à extinção (LOWE et al., 2005), pois, se devido a algum distúrbio ambiental ocorrer o aumento da autofecundação e dos cruzamentos entre indivíduos aparentados, poderá causar depressão por endogamia nas próximas gerações (LACERDA et al., 2008). Assim, se essas condições de endogamia persistirem, a heterozigotidade vai diminuir, resultando no aparecimento de alelos recessivos deletérios e na diminuição da capacidade da população responder a futuras mudanças ambientais.

#### 2.4 Fluxo Gênico

De acordo com Young et al. (2000), o fluxo gênico é definido como o movimento efetivo de genes entre populações ou subdivisões de populações. Pode ocorrer pelo fluxo de pólen quando ocorre a fertilização de um óvulo por um grão de pólen imigrante e pelo fluxo de sementes, quando sementes imigrantes se estabelecem em populações pré-existentes. Dessa forma, as distâncias entre as mudas e sua árvore matriz são usadas para estimar o fluxo de sementes, e as distâncias entre os doadores de pólen e as árvores matrizes são usadas para estimar o fluxo de pólen (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007).

O fluxo gênico foi dividido em vários tipos: o modelo continente ilha, onde tem um movimento unidirecional de uma população grande (continente) para uma população pequena e isolada (WRIGHT, 1943); o modelo de ilhas, em que a população é subdividida em subpopulações separadas geograficamente com o fluxo gênico ocorrendo ao acaso, e todas as populações contribuindo igualmente com o fluxo gênico, independente da distância (WRIGHT, 1931); o modelo no qual a migração só ocorre entre populações vizinhas, denominado de "stepping stone" (KIMURA, 1953) e o modelo de isolamento por distância, onde o fluxo gênico ocorre com maior frequência em indivíduos mais próximos, levando a uma diferenciação entre os grupos que estão espacialmente mais distantes (WHIGHT, 1943).

Em geral, o pólen é o que mantém o mecanismo de coesão genética entre as populações de espécies vegetais (FUCHS; HAMRICK, 2010). A distância de dispersão de pólen pode ser afetada pela sincronia ou assincronia da floração das plantas, pois de acordo com Augspurger (1980), se houver sincronia das plantas vizinhas, a distância de dispersão de pólen será curta devido à alta polinização entre plantas próximas, mas se ocorrer uma alta assincronia, a distância de dispersão será bem maior.

O fluxo de pólen combate os efeitos negativos da deriva genética, como a perda de alelos, aumento da endogamia e coancestria e a redução na heterozigotidade (BURCZYK et al., 2004), aumentando, assim, a diversidade genética, o número efetivo de doadores de pólen e o tamanho populacional dentro das famílias (MANOEL et al., 2012). Este é um aspecto importante da dispersão de pólen para a conservação genética, para a restauração ambiental e para o acasalamento, já que os padrões de cruzamento determinam as relações entre e dentro das famílias e, conseqüentemente, o tamanho efetivo das populações.

Diferentes tipos de polinizadores podem realizar o fluxo gênico por pólen. Nesse contexto, existe um conceito chamado de “síndrome de polinização” (VAN DER PIJL, 1972) que diz que as características da flor, tais como formato, cor, posicionamento e odor, além da morfologia das partes sexuais, como o gineceu e o androceu, vão estar relacionadas com algum tipo de polinizador que, portanto, estará adaptado. E também o fornecimento de substâncias nutritivas juntamente com o néctar atrairão bastante os polinizadores, servindo como alimento (RAVEN, 2001). Dentre os agentes de polinização estão o vento e a água, representantes de fatores abióticos. Os animais como besouros, abelhas, mariposas e borboletas, aves e morcegos, representam os agentes bióticos de polinização (RAVEN, 2001).

A análise da paternidade é uma das maneiras usadas para avaliar o fluxo gênico via pólen (SORK et al., 1999). Essa análise é utilizada para avaliar os efeitos das mudanças antropogênicas, como a fragmentação florestal e exploração madeireira (MARTINS et al., 2012).

O fluxo de pólen é mais eficiente do que o fluxo de sementes na geração de variabilidade genética, uma vez que tem um maior potencial para alcançar longas distâncias devido às características biológicas adaptadas e aos mecanismos de dispersão (ENNOS, 1994). A semente precisa primeiramente se transformar em plântula, se desenvolver e participar de um evento reprodutivo, o que a torna menos eficiente na expressão da sua composição genética (RIDLEY, 2006).

Apesar disso, o fluxo gênico por dispersão de sementes é uma das fases genéticas e demográficas mais importantes na vida de uma planta, pois é a única oportunidade, além da propagação vegetativa, para a colonização de novas áreas (HOWE; SMALLWOOD, 1982; HOWE; MIRITI, 2000). A dispersão de sementes é o deslocamento das mesmas através da liberação da mãe para outros locais (HOWE; SMALLWOOD, 1982). Esse evento é de extrema importância para a planta, pois leva a mudanças demográficas e genéticas, onde após a germinação e o estabelecimento da planta, novos indivíduos serão produzidos, bem como novos genótipos (JORDANO; GODOY, 2002).

Os tipos de dispersão de sementes ocorrem de três maneiras chamadas de “síndromes de dispersão” (VAN DER PIJL, 1972) e são classificados de acordo com a morfologia do fruto e da semente (RIDLEY, 1930). Existem as espécies zoocóricas, onde a dispersão ocorre por animais, em que os frutos são carnosos, suculentos e nutritivos; as espécies anemocóricas, que são dispensadas pelo vento, onde as sementes têm tamanho reduzido e na maioria apresentam plumas ou expansões aladas (HOWE; SMALLWOOD, 1982); As espécies autocóricas, que apresentam mecanismos de auto-dispersão de suas sementes; e as espécies hidrocóricas que tem a dispersão de sementes pela água, adaptando suas sementes para a flutuação.

Existem duas abordagens para se estimar o fluxo gênico em populações naturais, a abordagem direta e a abordagem indireta. Na abordagem direta, as metodologias se baseiam na observação do comportamento dos vetores do fluxo gênico, como observação dos polinizadores e dispersores de sementes ou ainda pode ser feito o acompanhamento da dispersão do pólen e da semente marcando estes com corantes (OUBORG et al.,1999; SLATKIN, 1985). Porém, essas observações não são totalmente eficientes já que fornecem apenas um indicativo. No entanto, a estimativa será eficiente se for realizada através de marcadores genéticos (LEVIN, 1981). Já a abordagem indireta baseia-se na distribuição da diversidade entre as populações para a obtenção do número de migrantes por geração (WRIGHT, 1931). Desde então, diversas variações foram propostas, tanto para o modelo populacional quanto para o parâmetro genético utilizado (OUBORG et al.,1999).

## **2.5 Marcadores Genéticos**

Os marcadores genéticos são caracteres com mecanismo de herança simples que podem ser empregados para avaliar as diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos

(BERED et al., 1997). Os marcadores genéticos estão divididos em dois grupos: os marcadores morfológicos e os marcadores moleculares.

Os marcadores morfológicos apresentam um fenótipo de fácil visualização determinado por um ou poucos locos (RAMALHO, 2004). Entretanto, esses tipos de marcadores possuem limitações para seu uso, pois existem em número limitado no genoma, e sua expressão gênica pode estar sujeita às variações do ambiente e à ação de outros genes (BORÉM, 2006). Já os marcadores moleculares utilizam técnicas que caracterizam geneticamente uma grande quantidade de genótipos, fornecendo subsídios para o entendimento dos processos microevolutivos que atuam na diferenciação das populações (REIS, 1996).

### 2.5.1 Microssatélites

Os microssatélites são sequências curtas de DNA (ácido desoxirribonucléico) repetidas em *tandem* que estão dispersas aleatoriamente ao longo do genoma (SOUSA et al., 2011). Apresentam-se tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras e são geralmente muito polimórficas devido ao alto nível de variação no número de repetições (ZANE et al., 2002). Essas curtas sequências possuem um par de iniciadores complementares que as flanqueiam, estão em regiões que sofrem taxas de mutação maiores que nas sequências de cópias únicas (PINTO et al., 2001). Apresentam multialelismo devido a diferentes números de unidades repetitivas dentro da sequência de microssatélites, que são ocasionadas por *crossing-over* desigual ou erro da DNA polimerase durante a replicação (BORÉM, 2006; LEVINSON; GUTMAN, 1987).

Essa é uma característica diferente dos outros marcadores em que a variação das repetições que geram o polimorfismo das bandas ocorre por mutações de ponto e por eventos de inserções/deleções (BROWN et al., 1996). Independentemente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (BORÉM, 2006). Além disso, possuem herança co-dominante, facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (PINTO, 2001).

Devido à alta variação genética, que os deixa com um forte poder de discriminação (CHASE et al., 1996), esses marcadores são importantes para responder questões sobre genética de populações, sobre padrões de fluxo gênico e sobre estudos de análise de

parentesco (MORGANTE; OLIVIERI, 1993; WRIGHT; BENTZEN, 1994), entre outras funções, como simplicidade técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo e grande poder de resolução (BORÉM, 1998). Outra característica que faz com que os microssatélites sejam bastante usados é sua alta reprodutibilidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) e capacidade se serem mais informativos (BRONDANI et al. 2002) comparados com outras classes de marcadores. Além disso, o uso desses marcadores permite uma amostragem muito eficiente do genoma e estimativa da divergência genética, variabilidade e discriminação entre genótipos (GRATTAPAGLIA, 2001).

A aplicação de microssatélites para a genética de populações e conservação das florestas tropicais é limitada devido à escassez de informações de sequências de DNA para muitas espécies de plantas tropicais (DAYANANDAN et al., 1999). Apesar de, atualmente, a quantidade de espécies com marcadores moleculares desenvolvidos ter aumentado, ainda há uma carência de desenvolvimento, caracterização e uso dos microssatélites em espécies de árvores neotropicais (BRAGA et al., 2007; REIS et al., 2009).

A grande limitação dos microssatélites é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie, não sendo possível utilizar “*primers* universais”, apesar de alguns trabalhos mostrarem que os marcadores microssatélites podem ser transferíveis entre espécies do mesmo gênero (CARVALHO, 2007; PEREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2013). No entanto, quando esses oligonucleotídeos apresentam-se informativos para uma espécie, os custos e a mão-de-obra reduzem drasticamente, tornando os ensaios laboratoriais rápidos e a técnica bastante acessível (BUSO et al., 2003).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Locais de estudo

Os estudos foram realizados em três ambientes de ocorrência de castanheiras representando floresta nativa, pastagem e plantio. Em cada um desses ambientes foi delimitada uma área de amostragem a qual foi denominada de “população”. A distância em linha reta, da pastagem para o plantio foi de aproximadamente 10 Km, enquanto que da floresta para esses dois ambientes foi de cerca de 140 Km (Figura 4).

A primeira área de estudo é um castanhal de floresta nativa com uma área de 420 ha localizado no Seringal Filipinas, este que fica dentro da Reserva Extrativista Chico Mendes no município de Epitaciolândia-AC. A segunda é composta por remanescentes de castanheiras nativas que foram mantidas quando houve o desmatamento para a formação de pastagem na Fazenda Santa Maria, no Km 17 da BR-317, município de Senador Guiomard-AC. Essa área de pastagem possui 163 ha, fica entre duas outras fazendas, tem uma pequena área de floresta ao fundo e tem cerca de 15 anos de formação. E a terceira área é um plantio de castanheiras com cerca de 30 anos de formação, localizado no campo experimental da Embrapa Acre no Km 14 da BR-364, município de Rio Branco-AC. Este plantio abrange uma área de aproximadamente 0,2 ha circulado por plantios de outras espécies e foi implementado com o objetivo de se ter uma coleção de trabalho para conservação genética da espécie. No entanto, não há registros da origem e nem da quantidade de populações naturais coletadas.

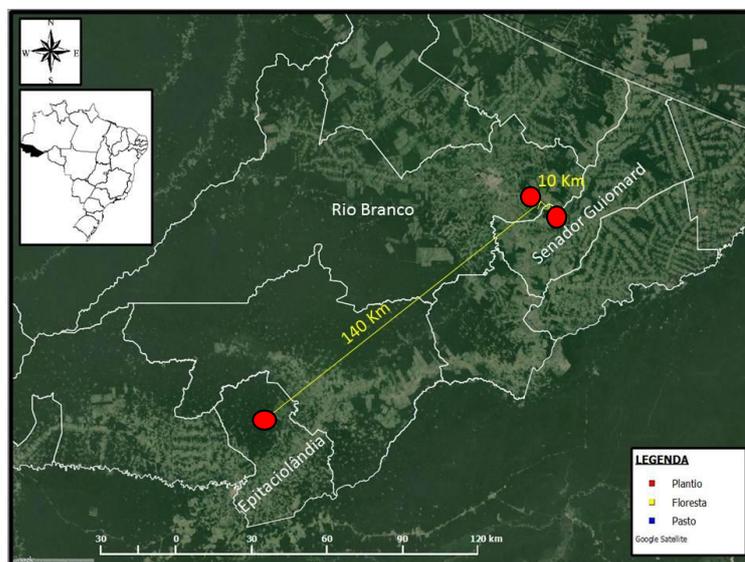


Figura 4. Local dos estudos indentificando as populações analisadas e a distância entre as mesmas. (Fonte: Alisson M. Munaretti, 2013)

### 3.2 Coleta de dados

Para a análise de diversidade genética foi feito o mapeamento de todas as castanheiras com sinais de início de reprodução (floração) nas três populações (denominado neste estudo de adultos), sendo coletada uma amostra de tecido cambial para posterior análise genética. Um mapeamento adicional e coleta de amostras de câmbio foram feitos na vizinhança da pastagem e do plantio a fim de amostrar possíveis doadores de pólen fora da população, onde todas as castanheiras em idade reprodutiva e dentro de um raio de 1000 metros ao redor destas áreas foram amostradas. Essas árvores foram utilizadas nas análises de fluxo gênico e paternidade. Na floresta, esta amostragem da vizinhança não foi feita pois a área amostral está dentro de uma floresta contínua. Todas as árvores encontradas foram mapeadas com auxílio de GPS 76CXS (Garmin). A Tabela 1 apresenta o tamanho amostral das populações para cada estudo realizado.

Para análise do sistema de reprodução, em cada ambiente foram amostradas matrizes para coleta de frutos e produção de mudas (Tabela 1). O número de matrizes amostradas no pasto e no plantio esteve condicionado à disponibilidade de frutos, uma vez que nem todas as árvores frutificaram.

De cada matriz, 10 ouriços foram coletados para produção das mudas. Foram obtidas, em média, trinta sementes por matriz (não foi considerada a quantidade de sementes por ouriço e sim por matriz). As sementes foram postas para germinar em caixas de areia, localizadas dentro do viveiro da Embrapa Acre, as quais foram mantidas úmidas por seis meses. Após esse período, as sementes foram retiradas da areia, descascadas e colocadas novamente nos caixotes para germinação. Após o lançamento das primeiras folhas, amostras foliares foram coletadas de 10 a 12 plantas por matriz. As folhas foram desidratadas em liofilizador e, posteriormente armazenadas em freezer (-20°C).

Tabela 1- Tamanho amostral das populações para cada um dos estudos realizados nas três populações.

Estudo		Floresta	Pasto	Plantio
Diversidade		357	50	76
Fluxo gênico e paternidade		433	78	150
Sistema de reprodução	Matriz	10	8	9
	Progênie	100	80	90

\* As matrizes já estão incluídas no tamanho amostral de diversidade, portanto não entraram no cálculo do total geral.

### 3.3 Extração de DNA e amplificação com os microssatélites

O DNA genômico total foi extraído a partir do câmbio das árvores adultas e das folhas das plântulas de acordo com o método descrito por Doyle & Doyle (1987), com o uso do macerador automático Tissue lyser (Quiagen). A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose (1%) corado com Gel Red (Biotium) e cada amostra foi comparada com padrões de fago Lambda de quantidades conhecidas (50 e 100 ng/μL). Posteriormente, o DNA foi diluído para 2,5 ng/μL para que fossem feitas as análises genéticas. Foram utilizados cinco locos microssatélites desenvolvidos por Reis et al. (2009) (Bex 02, Bex 03, Bex 22, Bex 27, Bex 37) e quatro locos não publicadas (Bes 13, Bes 14, Bes 18, Bes 19) totalizando nove locos. Nem todos os locos foram utilizados em todas as populações, o loco Bex 22 foi analisado apenas na floresta e os locos Bes 13, Bes 14, Bes 18, Bes 19 foram analisados para o pasto e plantio, pelo fato dos estudos terem sido realizados em épocas diferentes.

Os locos foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em um volume final de 13 μl, contendo 5 ng de DNA genômico, 0,25 mM de cada DNTP, 0,25 mg/ml de BSA, 0,25 mM tampão de reação da PCR 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada iniciador direto e reverso e 1 unidade de Taq polimerase (*CenBiot*). As amplificações foram feitas em um termociclador MJ 96+ da Biocycler de acordo com as condições descritas por Don et al. (1991).

As regiões microssatélites amplificadas foram analisadas em um genotipador automático (FS 96, Advanced Analytical), um sistema de eletroforese capilar baseado em fluorescência que, através de um corante intercalante acoplado a uma luz LED, elimina a necessidade do uso de primers marcados com fluoróforos, como acontece nos demais sequenciadores automáticos.

Após as genotipagens, os resultados foram avaliados quanto à qualidade das marcas obtidas, sendo as falhas repetidas. Apesar disso, não foi possível genotipar todos os indivíduos com a qualidade necessária, havendo casos em que o indivíduo (árvore) foi eliminado dos estudos. Para o estudo de diversidade genética, foram excluídas 66 árvores da floresta que apresentaram mais de um loco com dados faltantes. A Tabela 2 apresenta a quantidade total de indivíduos genotipados em cada ambiente.

Tabela 2: Número de genótipos considerados nas análises genéticas.

<b>Ambiente</b>	<b>Matriz</b>	<b>Progênie</b>	<b>Possível doador</b>	<b>Total geral</b>
<b>Floresta</b>	10	97	433	530
<b>Plantio</b>	9	97	144	241
<b>Pasto</b>	8	94	74	168
<b>Total</b>	27	288	624	939

\*As matrizes foram incluídas como possível doador de pólen.

### 3.4 Análises Estatísticas

A diversidade genética foi calculada para cada população através dos seguintes parâmetros: heteroziguidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e heteroziguidade esperada ( $\hat{H}_e$ ), número médio de alelos ( $\hat{A}$ ), número efetivo de alelos por loco [ $\hat{A}_e = 1/(1 - \hat{H}_e)$ ], índice médio de fixação de Wright ( $\hat{f}$ ), índice de fixação total das populações ( $\hat{F}$ ) e a divergência genética entre as populações ( $\hat{\theta}_p$ ), obtidas pelos programas GDA (LEWIS; ZAIKIN, 2001) e FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). As consistências das estimativas foram avaliadas por *bootstrap* utilizando 1000 reamostragens. O número médio de alelos foi comparado entre populações e gerações (geral e por população) utilizando o software SPSS 15.0 para Windows.

Também foi calculado o número de alelos privados em cada população, ou seja, alelos que estiveram presentes somente em uma população, utilizando o programa GDA (LEWIS; ZAIKIN, 2001). A consistência desses parâmetros foi baseada pelo método de reamostragem *bootstrap*, utilizando 1000 reamostragens sobre os locos com o intervalo de confiança de 95%.

Para a verificação dos *pools gênicos* representados em cada um dos três ambientes estudados, cada indivíduo foi separado em agrupamentos (*clusters*), onde foi atribuído a eles um valor de  $K$  que representa a quantidade de *pools gênicos* encontrados pelo programa STRUCTURE versão 2.3 (PRITCHARD et al., 2000). Para esta análise, o  $K$  variou de 1 a 12, com cinco simulações de cada  $K$ . O melhor valor de  $K$  foi determinado de acordo com os valores de  $\Delta K$ , segundo Evanno et al. (2005), presentes no aplicativo Structure Harvester v. 0.6.5 (EARL, 2011).

O programa CoreFinder 1.0 (POLICRITI; SGARRO, 2011) foi utilizado para calcular o número mínimo de indivíduos que representa toda a diversidade genética da população da floresta nativa e do pasto (coleção nuclear). No plantio, esse cálculo não tem sentido por não ser uma população natural. Considerando que uma coleção nuclear representa a riqueza alélica presente em uma população, esta análise pode indicar o tamanho mínimo amostral para futuros estudos genéticos com a espécie na região.

O sistema de reprodução foi avaliado, para cada ambiente, a partir do modelo misto e do modelo correlacionado usando o programa MLTR 3.4 (RITLAND, 2002), onde foram estimados os seguintes parâmetros: taxa de cruzamento multiloco ( $\hat{t}_m$ ), taxa de cruzamento uniloco ( $\hat{t}_s$ ), taxa de autofecundação ( $s = 1 - \hat{t}_m$ ), taxa de cruzamento entre indivíduos

aparentados ( $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ ), correlação de paternidade multiloco ( $\hat{r}_{p(m)}$ ) e correlação de autofecundação ( $\hat{r}_s$ ).

A partir das estimativas obtidas no MLTR foram calculados outros parâmetros de parentesco, como o número de doadores de pólen ( $\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_{p(m)}$ ), as frequências de meio-irmãos [ $\hat{P}_{hs} = (\hat{t}_m^2(1-\hat{r}_{p(m)}))$ ], de irmãos completos [ $\hat{P}_{fs} = (\hat{t}_m^2\hat{r}_{p(m)})$ ], de irmãos de autofecundação [ $\hat{P}_{ss} = \hat{s}^2$ ] e cruzamentos mistos de irmãos provenientes de dentro das famílias [ $\hat{P}_{shs} = 2\hat{s}\hat{t}_m$ ]. Os coeficientes de endogamia para os parentais ( $\hat{F}$ ) e progênes (Fp) foram calculados utilizando os programas MLTR e GDA, respectivamente. Para todas as estimativas, calculou-se o desvio padrão pelo método *bootstrap*, utilizando 1.000 repetições com intervalo de confiança de 95%.

O coeficiente de coancestria ( $\Theta$ ) dentro das famílias foi estimado a partir do coeficiente de parentesco:

$$r_{xy} = 0,25 (1 + \hat{F}_m)[4\hat{s} + (\hat{t}_m^2 + \hat{s}\hat{t}_m\hat{r}_s)(1 + \hat{r}_p)] \quad (1)$$

sendo que, para espécies diplóides, o coeficiente de coancestria é a metade do coeficiente de parentesco ( $\Theta = r_{xy}/2$ ).

O fluxo gênico foi avaliado de duas maneiras: o fluxo gênico aparente, que estima o número de migrantes a cada geração e o fluxo gênico de pólen avaliado pela distância geográfica entre determinada matriz e o possível doador de pólen identificado pelo programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). A taxa de pólen imigrante foi calculada para cada população pela proporção da progênie em que nenhum possível doador de pólen foi identificado (BURCZYK et al., 2004). A distância entre matriz e doador de pólen foi calculada pelo programa SPAGEDI 1.2 (HARDY; VEKEMANS, 2002).

O fluxo gênico aparente ( $Nm$ ) entre populações foi calculado pela abordagem indireta a partir dos valores estimados de  $F_{st}$  (divergência genética entre populações). Esse fluxo gênico foi calculado de acordo com o modelo proposto por Wright (1951), conforme a fórmula:

$$Nm = \frac{1}{4} \left( \frac{1}{F_{st}} - 1 \right) \quad (2)$$

A relação inversa, proposta na equação, entre  $F_{st}$  e  $N_m$  assume que os marcadores são neutros, que as populações estão arranjadas de acordo com o modelo de ilhas e que foi atingido o equilíbrio entre a deriva genética e migração.

Para o teste de paternidade utilizou-se o método da máxima probabilidade com base na comparação dos genótipos das castanheiras adultas amostradas em cada população e as progênes obtidas de cada matriz. A probabilidade de paternidade de cada candidato a doador de pólen foi medida pelo logaritmo de uma razão de probabilidades (LOD-score), conforme definido por Meagher (1986). Um LOD-score de valor positivo indica que o suposto doador de pólen tem maior probabilidade de paternidade que qualquer outro indivíduo da população.

A comprovação da paternidade foi feita com uso da estatística  $\Delta$ , em que se calcula a diferença em “LOD-score” entre o primeiro mais provável doador de pólen (com o maior “LOD-score”) e o segundo (com o segundo maior “LOD-score”). A confiabilidade da inferência paterna foi definida por meio da comparação do valor do  $\Delta$  calculado com um valor de  $\Delta$  crítico ( $\Delta_C$ ), abaixo do qual a paternidade não pode ser atribuída a um determinado nível de significância. Para esse trabalho utilizou-se o nível de significância de 80% e o  $\Delta_C$  foi obtido por meio de uma simulação como apresentado por Marshall et al. (1998). A simulação e os testes de paternidade foram realizados com o programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al. 2007).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Diversidade genética

A análise de marcadores microssatélites utilizando todos os indivíduos das três populações, resultou em fragmentos de DNA amplificados que variaram de 94 pb (Bex 03) a 264 pb (Bes 14). O número médio de alelos por loco foi 12,8 nos adultos 10,4 nas progênes (Tabela 3).

A quantidade de alelos identificada neste estudo foi maior que o encontrado por Reátegui-Zirena et al. (2009) para os locos Bex 03, Bex 22 e Bex 37 e por Soares et al. (2010) para o Bex 03. Este resultado pode ser devido ao tamanho amostral, pois neste estudo, o número de indivíduos avaliados por população foi muito maior que nos demais [pouco mais de 20 para Reátegui-Zirena et al. (2009) e 40 para Soares et al., (2010)], além do método de detecção dos produtos amplificados que foram diferentes.

Em todas as populações (ambientes) e gerações (adultos e progênes) o número efetivo de alelos por loco foi menor que o número médio de alelos por loco, indicando a presença de alelos com baixa frequência (GONELA et al., 2013). A floresta foi o ambiente que apresentou maior número efetivo de alelos (diversidade gênica). Em todos os ambientes, o  $\hat{A}_e$  foi maior nas castanheiras adultas do que nas progênes, sendo que a floresta foi o ambiente em que essa diferença foi significativa a 5%, sugerindo uma possível alteração nas frequências alélicas de uma geração para outra (Tabela 3).

Os resultados indicam que na pastagem houve perda de diversidade gênica quando comparada com a floresta nativa. Apesar de esses dois locais terem tamanhos amostrais diferentes (Tabela 1), essa diferença pode não ter influenciado na estimativa do número efetivo médio de alelos uma vez que Costa e Stefenon (2009) mostraram, por meio de simulações, que para populações com cruzamentos aleatórios e baixa endogamia, uma pequena quantidade de indivíduos pode refletir a real diversidade. Outro resultado que confirma a possibilidade de comparação entre estas populações é a estimativa do número de indivíduos que representam uma Coleção Nuclear para essas duas populações, pois os valores foram semelhantes, sendo 33 para a floresta e 28 para a pastagem (Figura 5). Como em ambas as populações a amostragem foi maior que esse número representativo, considera-se que a amostragem realizada não foi viesada.

Tabela 3- Caracterização dos locos quanto ao número de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e número de alelos efetivos ( $\hat{A}_e$ ) ; heteroziguidade esperada ( $\hat{H}_e$ ) e heteroziguidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e índice de fixação ( $\hat{f}$ ) para os adultos e as progênies nos três ambientes analisados. [NS: não significativo; \*: significativo (p<0,05); \*\*: significativo (p<0,01)]

Todos										
Loco	Adultos					Progênies				
	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$
Bex 02	7	3,88	0,742	0,054	0,274	7	1,06	0,0585	0,361	0,383
Bex 27	18	9,26	0,892	0,801	0,102	14	1,10	0,0880	0,914	-0,038
Bex 37	20	8,77	0,886	0,905	-0,021	17	4,33	0,769	0,950	-0,236
Bex 03	16	7,04	0,858	0,942	-0,099	14	3,73	0,732	0,932	-0,138
Bes 13	11	4,13	0,758	0,844	-0,115	9	1,06	0,0593	0,821	-0,386
Bes 18	8	2,79	0,642	0,805	-0,256	7	2,42	0,586	0,719	-0,228
Bes 19	13	3,89	0,743	1,000	-0,340	8	2,92	0,657	1,000	-0,525
Bes 14	8	3,00	0,667	0,374	0,441	9	2,76	0,638	0,451	0,294
Bex 22	14	5,03	0,801	0,926	-0,156	9	4,81	0,792	0,962	-0,216
Total	115					94				
Média	12,8	4,48	0,777	0,793	-0,020	10,4	3,26	0,693	0,770	-0,125
Plantio										
Loco	Adultos					Progênie				
	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$
Bex 02	4	3,62	0,724	0,562	0,226	5	1,63	0,386	0,198	0,488
Bex 27	10	5,88	0,830	0,769	0,074	10	4,55	0,780	0,955	-0,226
Bex 37	19	9,17	0,891	0,953	-0,070	14	5,71	0,825	1,000	-0,214
Bex 03	13	4,59	0,782	0,797	-0,019	12	3,24	0,691	0,915	-0,325
Bes 13	8	4,67	0,786	0,756	0,038	5	2,05	0,513	0,798	-0,550
Bes 18	7	2,71	0,631	0,792	-0,255	6	2,16	0,537	0,592	-0,105
Bes 19	12	3,91	0,744	1,000	-0,347	8	3,02	0,669	1,000	-0,500
Bes 14	7	2,76	0,638	0,318	0,503	8	3,48	0,713	0,438	0,387
Bex 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	80					68				
Média	10	4,05	0,753	0,743	0,013 <sup>NS</sup>	8,5	2,77	0,639	0,737	-0,154 <sup>**</sup>
Pasto										
Loco	Adultos					Progênie				
	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$
Bex 02	4	2,30	0,565	0,409	0,278	5	1,48	0,323	0,255	0,210
Bex 27	14	10,31	0,903	0,914	-0,013	11	8,62	0,884	0,976	-0,105
Bex 37	13	9,90	0,899	0,951	-0,059	9	2,79	0,641	1,000	-0,565
Bex 03	10	6,61	0,723	0,952	-0,321	10	3,51	0,715	0,865	-0,212
Bes 13	10	3,56	0,719	0,944	-0,320	7	3,04	0,671	0,851	-0,272
Bes 18	6	2,94	0,660	0,829	-0,260	7	2,50	0,600	0,833	-0,390
Bes 19	8	3,95	0,747	1,000	-0,343	5	2,62	0,618	1,000	-0,625
Bes 14	6	3,29	0,696	0,463	0,337	7	2,02	0,506	0,464	0,083
Bex 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	71					61				
Média	8,9	3,89	0,739	0,808	-0,094 <sup>**</sup>	11	2,63	0,620	0,781	-0,262 <sup>**</sup>
Floresta										
Loco	Adultos					Progênies				
	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$
Bex 02	7	3,55	0,718	0,551	0,233	7	2,07	0,517	0,637	-0,234
Bex 27	17	8,93	0,888	0,796	0,104	5	5,49	0,818	0,807	0,013
Bex 37	19	8,40	0,881	0,891	-0,012	7	3,61	0,723	0,850	-0,178
Bex 03	15	7,25	0,862	0,972	-0,127	7	3,03	0,670	0,706	-0,054
Bes 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bes 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bes 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bes 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bex 22	14	5,03	0,801	0,926	-0,156	9	4,81	0,792	0,962	-0,216
Total	72					35				
Média	14,4	5,88	0,830	0,827	0,004 <sup>NS</sup>	7	3,38	0,704	0,793	-0,127 <sup>**</sup>

Analisando o plantio, observa-se que a diversidade gênica dessa população foi semelhante à da pastagem. Apesar de não haver informações sobre o material genético que formou essa população, sabe-se que o número de locais e a quantidade de indivíduos amostrados foram restritos. Os resultados desse estudo sugerem que a amostragem original não foi suficiente para representar a diversidade gênica de populações naturais.

Em termos gerais, o número efetivo médio de alelos encontrado para as populações estabelecidas foi superior ao registrado em outros estudos com castanhais do Estado do Acre. Sujii (2011), avaliando a estrutura genética da castanheira em nove populações naturais da Amazônia, encontrou um número efetivo médio de alelos nas populações do Acre de 2,85 e 2,79 (valores calculados). Oliveira (2010) encontrou 2,13 e 2,41 alelos efetivos (valores calculados) em duas populações naturais, também do Acre, onde uma delas foi a mesma deste estudo. Apesar das diferenças de tamanho amostral entre esses estudos, todas foram maiores do que o tamanho representativo estimado para uma Coleção Nuclear (em média 30 indivíduos), sugerindo que a amostragem pode não ter sido a principal causa. Estudos mais aprofundados sobre as diferenças de genotipagens com diferentes métodos devem ser realizados, especialmente para estudos de estrutura genética em espécies arbóreas.

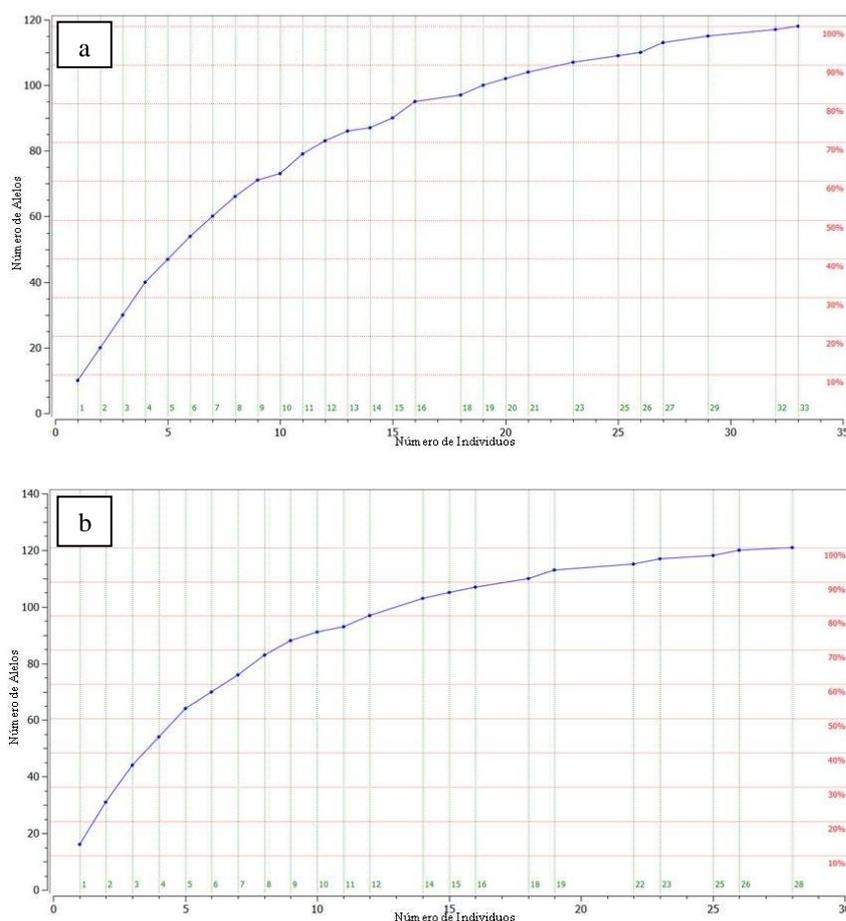


Figura 5 - Número de indivíduos representando a coleção nuclear de *B. excelsa* no (a) Seringal Filipinas (floresta) e na (b) Fazenda Santa Maria (pasto).

Outro parâmetro que avalia diversidade genética é a heterozigotidade média esperada ( $\hat{H}_e$ ). Neste estudo,  $\hat{H}_e$  foi de 0,784 e 0,703 para os adultos e progênies, respectivamente (Tabela 3), indicando uma alta diversidade genética em ambas as gerações. Resultados semelhantes foram encontrados por Reátegui-Zirena et al.(2009), Oliveira (2011) e Sujii (2011), porém com valores um pouco inferiores. Analisando os ambientes, esses valores diferiram um pouco, sendo que na floresta observou-se maior  $\hat{H}_e$ , tanto para os adultos quanto para as progênies. Em todas as populações,  $\hat{H}_e$  foi maior nos adultos que nas progênies, reforçando uma possível perda de diversidade ao longo das gerações.

Observando apenas os adultos e comparando com outros estudos, verifica-se que na floresta os cruzamentos foram aleatórios (panmixia) uma vez que o ( $\hat{H}_e$ ) e ( $\hat{H}_o$ ) não diferiram estatisticamente. Este resultado foi semelhante ao encontrado nos demais estudos de genética de populações da castanheira [Reátegui-Zirena et al. (2009), Oliveira (2011) e Sujii (2011)]. Por outro lado, foi observado no pasto um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentando excesso de heterozigotos ( $F_{is} = -0,095$ ;  $p=0,0021$ ) (Tabela 3). Nas progênies,

todos os ambientes, não estiveram no equilíbrio de Hardy-Weinberg observando-se excesso de heterozigotos.

Em todas as populações estudadas, foram encontrados alelos privados de cada população. No entanto, na população nativa (floresta), o número de alelos exclusivos foi bem maior que nas demais e também foi a única população que apresentou alelo exclusivo com frequência maior que 10% (Figura 6). Dos 43 alelos exclusivos encontrados, 24 foram na floresta, oito no plantio e cinco na pastagem. Esses resultados também indicam que no pasto e no plantio ocorreu perda de diversidade genética, onde pelo menos 12,5% de alelos frequentes na floresta não foram amostrados nos outros ambientes.

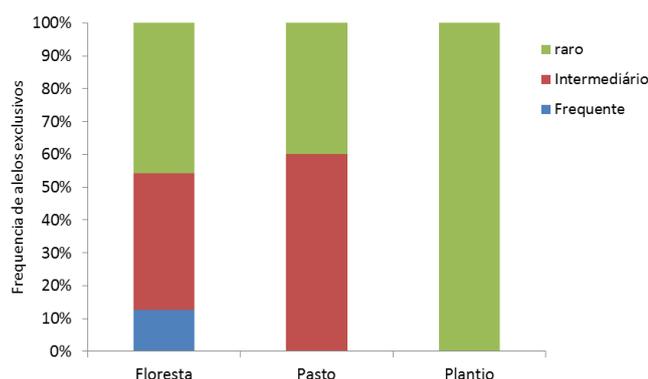


Figura 6- Frequência de alelos exclusivos classificados em raro (< 1%), intermediário (entre 1 e 10%) e frequente (> 10%), em cada população estudada de *Bertholletia excelsa*.

A divergência genética ( $\Theta$ ) entre os ambientes, considerando as gerações separadamente, foi significativa e apresentou menor valor para os adultos (Tabela 4). Esse resultado mostra que, quando comparadas as três populações, as progênies possuem uma maior divergência genética quando comparadas com os adultos, podendo indicar um efeito de deriva genética. Vale lembrar que na floresta essas progênies representam uma amostra pequena de matrizes (menor que o tamanho representativo) e que os indivíduos das progênies não estão estabelecidos na população. Eles representam uma amostra da recombinação existente no evento reprodutivo em que foi feita a coleta das sementes.

Tabela 4- Estatística  $F$  para os adultos e progênies dos três ambientes.

Geração	$f$	$F$	$\Theta$
Adultos	-0,0332 NS	-0,0034 NS	0,0288*
Progênies	-0,1976 NS	-0,0869 NS	0,0923*

NS: não significativo; \*: significativo ( $p < 0,05$ );

A análise bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE para as três populações indicou que o melhor valor de K foi três, evidenciando a presença de três grupos gênicos distintos. Apesar da formação dos grupos, não foi possível fazer uma distinção de cores por ambiente, indicando que todas as castanheiras fazem parte de um mesmo grupo genético ancestral (Figura 7). No entanto, a constituição genética das castanheiras encontradas no pasto apresentou uma maior proporção de um dos grupos gênicos (verde), corroborando com outros resultados anteriores de que há diferenças nas frequências alélicas entre esse ambiente e a floresta nativa.

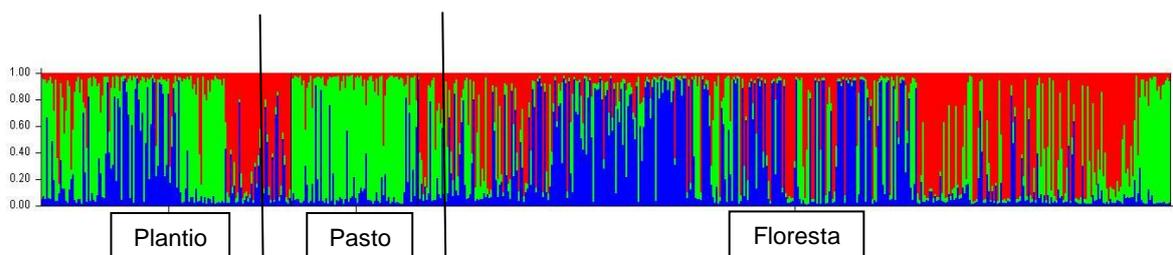


Figura 7- Representação de todos os indivíduos de *Bertholletia excelsa* nos três locais de estudo realizada com a análise bayesiana no programa STRUCTURE.

#### 4.2 Taxa de cruzamento

As taxas de cruzamento multilocus foram muito próximas da alogamia completa para todas as populações, inclusive com valores superiores a 1,0 (Tabela 5). Estimativas da taxa de cruzamento maiores que 1,0 devem ser interpretadas como 100% de cruzamento e não considerado seu valor nominal (JUNGHANS et al., 1998).

Poucos são os trabalhos que estimaram a taxa de cruzamento em *Bertholletia excelsa*, sendo encontrados apenas dois estudos. Ambos utilizaram marcadores de izoenzimas e tiveram um número muito pequeno de locos polimórficos, o que pode ter influenciado os resultados. O trabalho de O'Malley et al. (1988) foi o primeiro e único até os anos 2000. Neste trabalho, a taxa multilocus estimada foi de 0,85, sugerindo a ocorrência de autofecundação. Pardo (2001) encontrou valores superiores de  $\hat{t}_m$  (0,93, 0,93 e 1,00), estimados para uma população nativa de castanheiras e dois remanescentes em pastagem, respectivamente.

Os resultados do presente trabalho corroboram com Pardo (2001) e outros feitos com polinização controlada (CAVALCANTE, 2008), indicando um sistema de cruzamento predominantemente alógamo, com indicativo de autoincompatibilidade.

Tabela 5- Estimativas de taxa de cruzamento e os desvios padrões entre parênteses para *Bertholletia excelsa*.

Parâmetros	Estimativa		
	Floresta	Pasto	Plantio
<i>Sistema de reprodução</i>			
Taxa de cruzamento multilocus $\hat{t}_m$	0,977 (0,063)	1,118 (0,056)	1,200 (0,050)
Taxa de cruzamento unilocus $\hat{t}_s$	0,871 (0,047)	0,989 (0,045)	0,982 (0,067)
Correlação de autofecundação $\hat{r}_s$	0,207 (0,719)	-0,999 (0,204)	-0,999 (0,331)
Correlação de Paternidade $\hat{r}_{p(m)}$	0,428 (0,100)	0,327 (0,074)	0,349 (0,093)
Cruzamento entre parentes $\hat{t}_m - \hat{t}_s$	0,106 (0,039)	0,130 (0,072)	0,218 (0,083)
Numero efetivo de doadores de polen $\hat{N}_{(ep)}$	2,33	3,05	2,86
Taxa de autofecundação $\hat{s}$	0,023	0	0
<i>Endogamia e estrutura genética</i>			
Índice de Fixação Adultos $\hat{F}_a$	-0,200	0,014	0,082
Índice de Fixação Progênes $\hat{F}_p$	0,076	-0,086	-0,006
Endogamia por autofecundação $\hat{F}_{t_m}$	0,009	0	0
Endogamia por cruzamento entre parentes $\hat{F}_{t_m - t_s}$	0,067	-0,086	-0,006
Proporção de auto-irmãos $\hat{P}_{(ss)}$	0,0005(0,05%)	0	0
Proporção de irmãos completos $\hat{P}_{(fs)}$	0,4085 (40,85%)	0,327 (32,7%)	0,349 (34,9%)
Proporção de meio- irmãos $\hat{P}_{(hs)}$	0,546 (54,6%)	0,673 (67,3%)	0,651 (65,1%)
Proporção de irmãos de cruzamentos mistos $\hat{P}_{(hss)}$	0,0449 (4,5%)	0	0
Coeficiente de coancestria dentro das famílias $\theta$	0,146	0,168	0,182

No presente trabalho, buscou-se verificar se a formação de pastagens com castanheiras isoladas estaria afetando o sistema reprodutivo, sendo esperado encontrar aumento na taxa de autofecundação ou acasalamento entre indivíduos aparentados devido à retirada da floresta e dificuldade dos polinizadores em realizar voos a grandes distâncias abertas (MORI; PRANCE, 1990). No entanto, os resultados não confirmaram esta hipótese, verificando 100% de cruzamento entre as castanheiras da pastagem e do plantio. Outros estudos, como os de Centeno (citado por PARDO, 2001) e Cavalcante (2008), mostraram a presença de polinizadores tanto em áreas de pasto como em plantios, indicando que a hipótese de que as abelhas não conseguem visitar as castanheiras do pasto não é verdadeira. Desta forma, as altas taxas de cruzamentos observadas neste estudo podem estar associadas à mecanismos de autoincompatibilidade, conforme já citado por O'Malley et al. (1988) e Pardo (2001) em seus trabalhos.

Em todas as populações houve cruzamento entre indivíduos aparentados, sendo que na floresta foi onde se observou a menor taxa desse tipo de cruzamento. O plantio foi onde se observou maior cruzamento entre aparentados, o que poderia ser esperado uma vez que esta população foi formada artificialmente a partir de poucas matrizes e também pela distância de

fORAGEAMENTO do polinizador que, devido a maior densidade de castanheiras, favorece a concentração de polinizadores (AZEVEDO et al, 2007).

Apesar do cruzamento entre parentes ter sido menor na floresta, observou-se maior correlação de paternidade neste ambiente, sugerindo a ocorrência de cruzamentos preferenciais com formação de irmãos completos na mesma família. Este resultado pode ser um reflexo do comportamento de forrageamento do polinizador onde, na floresta, devido à maior dificuldade de se encontrar as castanheiras, o polinizador fica mais tempo em uma mesma árvore (BAWA, 1990) e promove com isso a fertilização de várias flores com o pólen de um mesmo doador de pólen. Nos outros ambientes, essa correlação foi um pouco menor provavelmente devido à densidade de árvores e maior facilidade do polinizador visitar várias árvores num curto espaço de tempo.

A distribuição de parentesco dentro das famílias foi calculada a partir das taxas de cruzamento multilocus e da correlação de paternidade. Em todas as populações as progênies foram compostas predominantemente de meio-irmãos (54,6% na floresta; 67,3% no pasto; e 65,1% no plantio), seguido de irmãos completos (40,85% na floresta; 32,7% no pasto e 34,9% no plantio). A floresta foi o único ambiente que apresentou alguma proporção de irmãos de autofecundação (0,05%) e irmãos provenientes de cruzamentos mistos (4,5%) (Tabela 5).

Analisando cada ambiente separadamente e comparando as gerações, o índice de fixação para os adultos do pasto e do plantio foi baixo, porém significativo, sugerindo que houve pequena seleção contra heterozigotos nesses ambientes. Os resultados citados anteriormente podem ser a causa da maior taxa de cruzamento observada no pasto e no plantio, como já foi mostrado. Já para as progênies, pode-se verificar que somente a floresta apresentou valor positivo, mostrando que nesse ambiente houve endogamia causada tanto por autofecundação como por cruzamentos entre parentes (endogamia biparental).

Em todas as populações, o coeficiente de coancestria dentro das famílias foi maior que o esperado para progênies de meios-irmãos (0,125), sugerindo cruzamentos não aleatórios (Tabela 5). Como apenas na floresta houve uma pequena taxa de autofecundação, e em todos os ambientes observou-se endogamia por cruzamento entre parentes, e o coeficiente de coancestria foi menor que 0,25, a coancestria média entre os parentais que deram origem às progênies em todas as populações deve estar entre o grau de meios-irmãos (0,125) a irmãos-completos (0,25).

Os resultados de estrutura parental sugerem que a diversidade genética das populações de *Bertholletia excelsa* esteja estruturada em grupos de famílias e que certos níveis de

endogamia biparental podem ser esperados nas populações. No entanto, os estudos de Reátegui-Zirena et al. (2009), Oliveira (2011) e Sujii (2011) não encontraram endogamia nas populações de adultos estabelecidos, assim como nesse estudo para a floresta nativa, sugerindo que outros mecanismos podem agir na natureza a fim de se evitar a endogamia. Nesse sentido, as progênies analisadas neste estudo foram provenientes de sementes coletadas e não de regeneração estabelecida na população e, portanto, não houve nenhuma ação de seleção sobre essas plantas. Oliveira (2011) avaliou regenerantes em duas populações e em uma delas encontrou endogamia enquanto que na outra não.

### 4.3 Fluxo gênico e análise de paternidade

O número total de progênies analisadas foi 288. O teste de paternidade (considerando 80% de probabilidade) possibilitou a identificação de possíveis pais para 104 progênies, com 63% de imigrantes participando dos cruzamentos nas populações. As outras 184 progênies tiveram seus doadores de pólen fora dos limites coletados para a população. Para cada ambiente separado, foram encontrados pais para 19 progênies, tanto na floresta como no plantio, e 66 progênies no pasto.

Na floresta, a taxa de imigração de pólen estimada foi de 80,4%, enquanto que no pasto e no plantio foi de 46,8% e 40,2%, respectivamente (Tabela 6). A delimitação geográfica da população de castanheiras e o mapeamento da vizinhança no pasto e no plantio foram mais fáceis que na floresta e, talvez, esse seja um dos motivos que explique a baixa proporção de doadores de pólen encontrada dentro da floresta.

Tabela 6. Média da estimativa de imigração de pólen dentro das famílias em cada ambiente amostrado onde a taxa de pólen está expressa.

Ambiente	Número de progênies	Total de progênies com possíveis pais encontrados	Progênies com possíveis pais dentro da população	Progênies com possíveis pais nas vizinhanças	Taxa de pólen imigrante
Floresta	97	19	19	0	80,4%
Pasto	94	66	50	16	46,8 %
Plantio	97	19	12	7	40,2%

A partir da análise de paternidade, foram obtidas as distâncias médias de dispersão do pólen que variaram bastante da floresta para o pasto e plantio com médias de 945 m, 442m e 446 m, respectivamente.

Os resultados de taxa de cruzamento e fluxo gênico indicam que não houve deficiência de polinizador nas pastagens, já que foi observado fluxo gênico de pólen em todas as direções

e distâncias (Figura 8). Parece que em áreas mais abertas, como o plantio e pastagem, há maior contribuição de indivíduos próximos na composição genética das gerações. Apesar do fluxo médio de pólen encontrado na floresta ter sido mais que o dobro dos outros ambientes, as distâncias variaram de 100 a 2.076 metros, mostrando que os polinizadores voam grandes percursos. O mosaico florestal, composto por árvores em florescimento e outras não, pode favorecer o maior alcance de voo do polinizador na floresta, enquanto que no pasto e no plantio a matriz de floração é mais densa e resulta em menores distâncias de voo do polinizador (AZEVEDO et al., 2007).

O fluxo gênico aparente entre as populações foi estimado em 9,30 imigrantes por geração mostrando que, a cada geração, estão entrando nas populações aproximadamente nove novos indivíduos para manter a variabilidade genética. A manutenção da variabilidade das populações é importante, pois torna a população menos suscetível ao aparecimento de homozigotos, o que a deixa com a maior capacidade para responder a futuras mudanças ambientais e também ajuda no manejo dos recursos genéticos para fins de conservação ou domesticação (FALK et al., 2001).

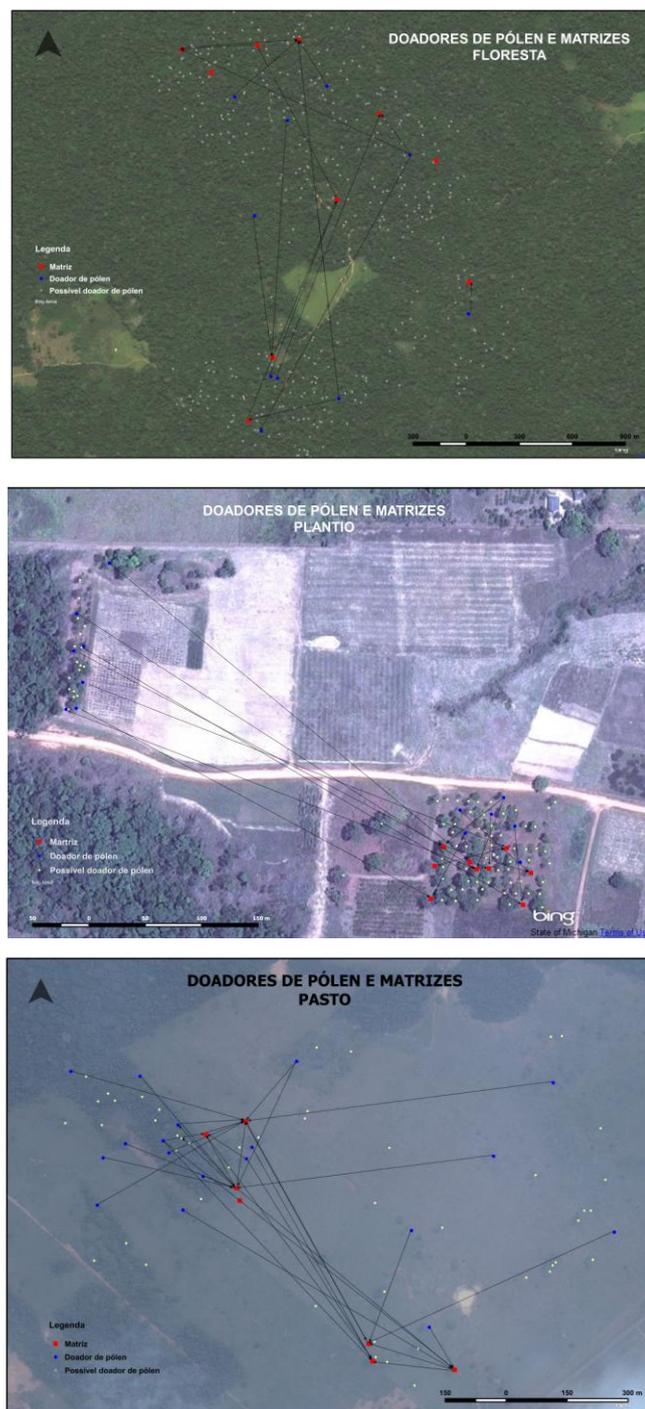


Figura 8- Esquema em imagem de satélite mostrando a posição geográfica das árvores, as direções e distâncias de migração de pólen em *Bertholletia excelsa*, nas populações de floresta nativa, plantio e pastagem. (Fonte: Alisson M. Munaretti, 2013)

## 5. CONCLUSÕES

- *Bertholletia excelsa* apresentou alta diversidade genética, estimada tanto pelo número de alelos por loco como pela heterozigosidade;
- Houve perda de diversidade gênica da floresta para a pastagem e, em todos os ambientes, houve perda de diversidade dos adultos para as progênies, principalmente na floresta;
- As populações foram divergentes geneticamente, sendo que as progênies apresentaram maior diferenciação que os adultos, indicando um possível efeito de deriva genética ao longo das gerações;
- Aproximadamente 33 indivíduos representam toda a variabilidade genética presente dentro de uma população natural na área deste estudo;
- Observou-se endogamia apenas para os adultos do pasto, enquanto que nas progênies, em todos os ambientes foi verificado a presença endogamia;
- Todas as populações apresentaram altas taxas de cruzamento, sendo que no pasto e plantio esta foi de 100%. Em todos os ambientes houve cruzamento entre indivíduos aparentados, sugerindo uma estrutura de famílias dentro das populações;
- A correlação de paternidade foi maior na floresta, sugerindo a ocorrência de cruzamentos preferenciais com formação de irmãos completos na mesma família;
- A distância média de fluxo gênico, via pólen, foi longa para todas as populações, variando de 442 m a 945 m, para o pasto e floresta respectivamente.
- Os resultados de taxa de cruzamento e fluxo gênico apresentados neste trabalho, podem ajudar no entendimento de como a espécie se comporta nos diferentes ambientes a fim de promover, futuramente, sua adaptação em novos ambientes e, também, a domesticação da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Edgard Blucher, 1971.
- ARGOLO, V. M.; WADT, L. H. O. Abelhas visitantes de flores de *Bertholletia excelsa* em área de plantio e floresta nativa - Rio Branco Acre. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2003, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: Editora da Universidade do Ceará. 2003.
- AUGSPURGER, C.K. Mass-flowering of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. **Evolution**, n. 34, p. 475–488, 1980.
- BARBUJANI, G. Autocorrelation of gene frequencies under isolation by distance. **Genetics**, v. 117, n. 4, p. 777-782, 1987.
- BARREIRA, S., SEBBENN, A. M., SCOLFORO, J. R. S., & KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sob exploração. **Scientia Forestalis**, v. 71, p. 119-130, 2006.
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species for a lowland tropical community. **Evolution** n. 28, p. 85-92, 1974.
- BAWA, K.S.; O'MALLEY, D.M. Estudios genéticos y sistemas de cruzamiento en algunas especies arbóreas de bosques tropicales. **Revista de Biología Tropical** v.35, p.177-188, 1985.
- BAWA, K. S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics** v.21, p.399-422, 1990.
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v. 99, n. 6, p. 580-591, 2007.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV. 2006. 374p.
- BRAGA, A.C., REIS, A.M.M., LEOI, L.T., PEREIRA R.W., et al. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes** n.7 p.53-56. 2007.
- BRONDANI, C., RANGEL, P.H.N., BRONDANI, R.P.V. & FERREIRA, M.E. 2002. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice

(*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**. n. 104, p.1192-1203.

BUCKLEY DP, O'MALLEY DM, APSIT V, PRANCE GT, BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae) .**Theoretical and Applied Genetics**, n.76, p.923- 928, 1988.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel?. **Forest Genetics**, v. 11, n. 3-4, p. 179, 2004.

BUSO, G.S.C., CIAMPI, A.Y., MORETZSOHN, M.C., AMARAL, Z.P.S. E.BRONDANI, R.V. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. **Biotecnologia & Desenvolvimento**, n.30, p.46-50, 2003.

CARVALHO. A.C. **Transferabilidade de microssatélites de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose**. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

CASCANTE, A. et al. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation biology**, v. 16, n. 1, p. 137-147, 2002.

CAVALCANTE, M. C. **Abelhas polinizadoras da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) sob cultivo na Amazônia Central: papel do néctar e do entorno do plantio na polinização da cultura**. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

CAVALCANTE, M. C.; OLIVEIRA, F. F.; MAUE´S. M.; FREITAS, B. M. Pollination requirements and foraging behavior of potential pollinators of cultivated brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) trees in Central Amazon Rainforest. **Psyche** , v. 2012, p. 1-9, 2012.

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

CHASE, M.; MOLLER, C.; KESSELL, R.; BAWA K. Long distance gene flow patterns precisely characterized by simple sequence repeats in a fragmented tropical tree population. **Nature**, n. 383, p. 398–399. 1996.

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

CONTE R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microsatélites**. Piracicaba, 2004. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

COSTA,L.S.; STEFENON, V.M. Interferência do número de indivíduos amostrados na estimativa de índices de diversidade genética, riqueza alélica e taxa de endogamia de plantas. In: Congresso Brasileira de Genética, 55°. 2009. *Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética*. Águas de Lindóia-SP, 2009.

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

DON R.H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, n. 19, 4008, 1991.

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

ENNOS, R.A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity** n.72, p.250–259. 1994.

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

FALK, D.A. et al. **An introduction to restoration genetics**. Society for Ecological Restoration and Plant Conservation Alliance. 2001. 30p

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3a. Ed. Brasília: CENARGEM-EMBRAPA, 1998, 220p.

FUCHS, E.J.; LOBO, J.A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, v.17, n.1, p.149-157, 2003.

FUCHS, E.L.; HAMRICK, J.L. Mating system and pollen flow between remnant populations of the endangered tropical tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). **Conservation Genetics** n.1, p.175–185. 2010.

GONELA, A.; SEBBENN, A.M.; SORIANI, H.H., MESTRINER, M.A., MARTINEZ, C.A., ALZATE-MARIN, A.L. Genetic diversity and mating system of *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae/Caesalpinioideae). **Genetics and Molecular Research**. n. 12, v.1, p.569-80, 2013.

GRATTAPAGLIA, D. **Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo**. In **Recursos genéticos e melhoramento – plantas** (L.L. Nass, A.C.C. Valois, I.S. Melo & M.C. Valadares-Inglis, eds.). Fundação MT, Rondonópolis, p.967-993, 2001.

GRIBEL, R., LEMES, M.R., BERNARDES, L.G., PINTO, A.E., Jr SHEPARD, G.H. Phylogeography of Brazilnut tree (*Bertholletia excelsa*, *Lecythidaceae*): Evidence of human influence on the species distribution. Association for Tropical Biology and Conservation, Morelia. 2007.

GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. **Heredity**, n. 86, p.485–486, 1995.

GUSSON,E.;SEBBENN,A.M.;KAGEYAMA,P.Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, n. 67, p. 123-135, 2005.

HAMRICK J.L. **Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations**. In: **Differentiation patterns in higher plants**. Academic press, p. 53-67. 1987.

HAMRICK, J.L. Genetic and conservation in tropical forest. In: ASEAN-CANADA SYMPOSIUM ON GENETIC CONSERVATION AND PRODUCTION OF TROPICAL

TREE SEED. DRYSDALE, 1993, Saraburi, Thailand, **Proceeding...** Saraburi, Thailand: ASEAN-Canada Forest Tree Center, P. 1-9. 1993

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M. et al. **Genetic and Conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, p.335-348. 1983.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.. **Allozyme diversity in plant species. In Plant population genetics, breeding and genetic resources** (A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir, eds). Sinauer, Sunderland, p.43-63. 1989

HARDY, O. J. et al. Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. **Genetics**, v. 168, n. 3, p. 1601-1614, 2004.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X.. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology notes**, v. 2, n. 4, p. 618-620, 2002.

HAUGAASEN, J. M.; HAUGAASEN, T.; PERES, C. A.; GRIBEL, R.; WEGGE, P. Seed dispersal of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) by scatter-hoarding rodents in a central Amazonian forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 26, n. 03, p. 251–262. 2010.

HIRAO, A. S.; KAMEYAMA, Y.; OHARA, M.; ISAGI, Y.; KUDO, G. Seasonal changes in pollinator activity influence pollen dispersal and seed production of the alpine shrub *Rhododendron aureum* (Ericaceae). **Molecular Ecology** n.15, p.1165–1173, 2006.

HOLSINGER, K.E.; GOTTLIEB, L.D. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. **Genetics and conservation of rare plants**, v. 195, p. 208, 1991.

HOWE H.F., MIRITI M.N. No question: seed dispersal matters. **Trends in Ecology & Evolution**. n.15, p.434–436. 2000.

HOWE HF, SMALLWOOD J.. Ecology of seed dispersal. **Annu Rev Ecol Syst**. n.13 p.201–228. 1982.

JUNGHANS, T. G.; PETERS-ROBINSON, I.; BERTOLUCCI, F. L.; ALFENAS, A. C. The use of self incompatibility in the production of hybrid eucalyptus seed by .Aracruz Celulose. in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 375- 379, 1998.

KAGEYAMA, P. et al. Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western Amazonian settlements. **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: IPGRI, p. 149-217, 2004.

KAINER, K.A.; WADT, L.H.O.; STAUDHAMMER, C.L. Explaining variation in Brazil nut fruit production. **Forest Ecology and Management**, v. 250, n. 3, p. 244-255. 2007.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1106, 2007.

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

KIMURA, M. Stepping-stone model of populations. **Annual Report of the National Institute of Genetics**, v.3, p.62-63, 1953.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N.M.; AIZEN, M.A.; GEMMILL-HERREN, B.; LEBUHN, G. & MINCKLEY, R. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecological Letters**, n.10, 299–314, 2007.

LACERDA, A. E.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A. M. Effects of Reduced Impact Logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n3, p.1034-1043. 2008.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. 2001.

LIMA, L. M. da S.; WADT, L. H. de O.; MARTINS, K. Fenologia de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), castanheira (*Bertholletia excelsa* HBK.) e copaíba (*Copaifera* spp), no município de Rio Branco, Acre. In: Seminário de Iniciação Científica, 16; Mostra de Pesquisa e Pós-graduação, 6, 2007, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco, AC: Universidade Federal do Acre. 2007.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. John Wiley & Sons, 2004. 432 p.

LOWE, A.J.; BOSCHER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for Neotropical trees. **Heredity** n. 95, p. 255-273. 2005.

MANOEL, R. O. et al. Contemporary pollen flow, mating patterns and effective population size inferred from paternity analysis in a small fragmented population of the Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae). **Conservation Genetics**, v. 13, n. 3, p. 613-623, 2012.

MARSHALL, D. L.; FOLSOM, M. W. Mate choice in plants: an anatomical to population perspective. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 22, n. 1, p. 37-63, 1991.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **IPEF**, n. 35, p. 71-78, 1987.

MARTINS, K.; RAPOSO, A.; KLIMAS, C.A.; VEASEY, E.A.; KAINER, K.; WADT, L.H.O. Pollen and seed flow patterns of *Carapa guyanensis* Aublet. (Meliaceae) in two types of Amazonian forest. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 818-826, 2012.

MAUÉS, M.M.; SOUZA, M.S.; KANASHIRO, M. **The importance of solitary bees on the reproductive biology of timber trees at the Tapajós National Forest, Brazil**. In: Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination., 2004, Beberibe, Ceará.. Proceedings of the International Workshop on Solitary Bees.. Universidade Federal do Ceará: Imprensa Universitária, p. 241-254, 2004.

MAUÉS, M. M. Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excels* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. In: KEVAN, P.; IMPERATRIZ, V. L. F. (Eds). **Pollinating bees – the conservation link between agriculture and nature**. Ministry of the Environment, Brasilia. p. 245-254. 2002.

MEAGHER T.R.; THOMPSON E. The relationship between single parents and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. **Theoretical Population Biology**, Amsterdam, v.29, n.1, p. 87-106, 1986.

- METTLER, L.E.; GREGG, T.G. **Genética de populações e evolução**. São Paulo: Editora Polígono, 1973. 262p
- MILLAR, M.A.; BYRNE, M.; COATES, D.J.; STUKELY, M.J.C.; McCOM, J.A. Mating system studies in jarrah, *Eucalyptus marginata* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.48, p.475-479, 2000.
- MORAES, M.;L.T.; SEBBENN, A.M. Pollen dispersal between isolated trees in the Brazilian Savannah: a case study of the neotropical tree *Hymenaea stigonocarpa*. **Biotropica**, v. 43, n. 2, p. 192-199, 2011.
- MORGANTE M.; OLIVIERI A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant J.** 3: 175-182. 1993.
- MORIS,A., PRANCE,G.T. Taxonomy, ecology and economic botany of the brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, v. 8, p.130-150. 1990.
- MORITZ,A., Estudos biológicos da floração e frutificação da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). EMBRAPA. Belém, Brasil. 1984.
- MORITZ,A.; LUDDERS,P. Blütenbiologie, Pollentübertragung und Beurteilung von Mutterklonen der Paranuss (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.). **Angewandte Botanik**, v. 67: n. 1, p. 47-51. 1993a.
- MORITZ,A.; LUDDERS,P. Pollenkeimung, Pollenschlauchwachstum und Befruchtungsverhalten verschiedener Klone der Paranuss (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.). **Angewandte Botanik**, v. 67, n. 3, p. 107-112. 1993b.
- MÜLLER,C.H., RODRIGUES,I.A., MÜLLER,A.A., MÜLLER,N.R.M. **Castanha-do-Brasil: Resultados de pesquisa**. EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária do Tropicó Úmido. Miscelânea 2, 1-25. 1980.
- MURAWSKI, D. A. AND HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, n. 67, p. 167-174. 1991.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.

NEI, M. The theory and estimation of genetic distance. pp. 45-54. 1973. In: GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS. Edited by N. E. MORTON, University Hawaii Press, Honolulu.

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

OLIVEIRA, A.F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 25, n.3, p. 331-338. 2002

OLIVEIRA, R. S. Dinâmica de regeneração e estrutura genética de Castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em duas populações exploradas no Vale do Rio Acre. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais)- Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2011.

ORTIZ, E. G. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). In: SHANLEY, P., PIERCE, A. R., LAIRD, S. A., GUILLEN, A. (Eds.). **Tapping the green market: Certification and management of non-timber forest products**. London: Earthscan Publications Ltd. p. 61-74. 2002.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, v. 87, n. 4, p. 551-568, 1999.

PARDO, M. **Estrutura Genética de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em Floresta e em Pastagens no Leste do Estado do Acre**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Piracicaba, SP. 2001

PEREIRA, A. A.; CLEMENT, C. R.; RODRIGUES, D. P. Transferabilidade de locos microssatélites de pupunha (*Bactris gasipaes*) e coco (*Cocos nucifera*) para buriti (*Mauritia flexuosa*). In: Reunião Anual da SBPC, 61, 2009, *Annais....* Manaus. 2009.

PERES, C. A.; SCHIESARI, L. C.; DIAS-LEME, C. L. Vertebrate predation of brazil- nuts (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) an agouti dispersed Amazonia seed crop: A test of the escape hypothesis. **Journal of Tropical Ecology**, v.13, n.1, p. 69-79. 1997.

PIJL, L. van der. **Principles of dispersal in higher plants**. 1972.

PINHEIRO, E.;ALBUQUERQUE, M. Castanha-do-pará. In: BRASIL. Ministério da Agricultura. Livro anual da agricultura. Brasília. P. 224-33. 1968.

PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. Isoenzimas e Microsatélites em Plantas. **Biotecnologia & Desenvolvimento**, n.20, p.16-19, 2001.

POLICRITI, A.; SGARRO, A. **CoreFinder** v.1.0. 2011.

PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, n. 155, p. 945-959. 2000.

RAJORA, O. P.; PLUHAR, S. A. Genetic diversity impacts of forest fires, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and applied genetics**, v. 106, n. 7, p. 1203-1212, 2003.

RAVEN, J. C. Court, JH & Raven, J. **Raven, Matrices Progresivas**. 2001.

REÁTEGUI-ZIRENA, E. et al. Evaluación de la variabilidad genética de la castaña *Bertholletia excelsa* en la región de madre de dios (Perú), mediante marcadores microsatélites. **Folia Amazónica**. V.18, n.1-2, p.41-50, 2009.

REIS, A.; BRAGA, A.; LEMES, M.; GRIBEL, R.; COLLEVATTI, R. Development and characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree *Bertholletia excels* Humb. & Bonpl.(Lecythidaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 3, p. 920–923.2009.

REIS, M.S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais de plantas. **Brazilian Journal of Genetics** n. 19, p.37-47. 1996

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M.. Genética da conservação em espécies vegetais do Cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, 2010.

RIDLEY, H.N. **Dispersal of plants throughout the world**. 1930.

RIDLEY, M. **Evolução**. Ed. Artmed, 2006.

RITLAND K Estimation of gene frequency and heterozygosity from pooled samples. **Molecular Ecology Notes** n. 78 p.370–372, 2002.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution** n.43, p.848-859, 1989.

RITLAND,K. **Multilocus mating system Program MLTR**: version 1.1. Toronto: University of Toronto, 1997.

SANTOS,J.C.;SENA,A.L.S.;ROCHA,C.I.L. Competitividade brasileira no comércio internacional de castanha-do-brasil. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 48., 2010, Campo Grande. *Resumos...* Campo Grande: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2010.

SEBBENN, A.M. **Estrutura genética de populações de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.) por caracteres quantitativos e isoenzimáticos**. 2001. 210p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SEBBENN, A.M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.14, n.2, p.115-132, 2002.

SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In *Pomares de sementes de espécies nativas* (A.R. Higa & L. Silva, eds.). Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná – Fupef, Curitiba, p.193-138. 2006.

SEBBENN, A.M. Tamanho amostral para conservação ex situ de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.15, n.2, p.109-124, 2003.

SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA, E.; NOGUEIRA, R.C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) utilizando

marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Ppymorphic DNA). **Magistra**, v. 18, n. 1, p. 42-47. 2006.

SHAANKER, R. U., GANESHIAIAH, K. N. AND BAWA, K. S. Parent-off spring conflict, sibling rivalry, and brood size patterns in plants. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 19, 177-205.1988

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

SHEPARD JR, G. H.; RAMIREZ, H. “Made in Brazil”: Human Dispersal of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in Ancient Amazonia1. **Economic Botany**, v. 65, n. 1, p. 44-65, 2011.

SILVA, M. F. N. S.; ALBUQUERQUE, L. B.; ANTONIO, R. P.; FERNANDES, C. H.; LIMA E SILVA, P. S.; SILVEIRA, L. M.; FILHO, J. T. Transferabilidade de primers microssatélites de *Phaseolus vulgaris* para *Vigna unguiculata*. In: Congresso Nacional de Feijão-Caupi,3, 2013, Recife, Annais..., Recife, 2013.

SILVA. A.C.C. **Remoção e destino de sementes de *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae) e *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae) no Sudoeste do Estado do Acre, Brasil**. Dissertação (Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais)- Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2009.

SLATKIN, Montgomery. Gene flow in natural populations. **Annual review of ecology and systematics**, p. 393-430, 1985.

SOARES, L.C.R.; LEMES, M.R.; SARDELLI, C.H. Caracterização genética de uma população natural de castanheira (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) da região do rio Purus, AM, utilizando marcadores de DNA microssatélites. In: Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM, 19, 2010, Manaus. *Resumos...*, Instituto de pesquisas para a Amazônia, 2010.

SORK, Victoria L. et al. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 6, p. 219-224, 1999.

SOUSA, A. C. B.; CARVALHO , M. A. ; RAMOS, A. K. B. ; CAMPOS, T. ; SFORÇA, D. A. ; ZICCHI, M.I. ;JANK, L.; SOUZA, A.P. Genetic studies em *Centrosema pubescens*

benth, a tropical forage legume: the mating system, genetic variability and genetic relationships between *Centrosema* species. **Euphytica**, v.181, n.2, p.223-235, 2011.

STOIAN, D. **Making the best of two worlds: rural and peri-urban livelihood options sustained by nontimber forest products from the Bolivian Amazon**. *World Development* 33, 1473-1490. 2005.

SUJII, P.S.; **Diversidade e estrutura genética de *Bertholletia excelsa*, uma espécie amazônica de ampla distribuição**. Dissertação (Instituto de Biologia)- Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2011.

SUJII, P.S.; FERNANDES, E.T.M.B.; AZEVEDO, V.C.R.; CIAMPI, A.Y.; MARTINS, K.; WADT, L.H.O. Morphological and molecular characteristics do not confirm popular classification of the Brazil nut tree in Acre, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 4018-4027, 2013.

SURLES, S. E. et al. Genetic relatedness in open-pollinated families of two leguminous tree species, *Robinia pseudoacacia* L. and *Gleditsia triacanthos* L. **Theoretical and applied genetics**, v. 80, n. 1, p. 49-56, 1990.

TONINI, Helio. Fenologia da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl., Lecythidaceae) no sul do Estado de Roraima. **Cerne**, v. 17, p. 123-131, 2011.

VAN DER PIJL, L. **Principles of dispersal in higher plants**. 3.ed. New York: Springer Verlag, 1982. 214 p.

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

WADT, L. H. O.; KAINER, K. A. Domesticação e Melhoramento da Castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.). In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Eds.). **Domesticação e melhoramento: espécies Amazônicas**. Universidade Federal de Viçosa. 2009. Cap. 15, p. 297-317.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics** v.16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics** v.28, p. 114-138, 1943.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, p. 395-420, 1965.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354, 1951

YOUNG, A.G.; BOYLE, T.J. Foresta Fragmentation. In: A. Young, D. Boshier, T. Boyle (Eds.) **Forest conservation genetics: principles and practice**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. P. 123-134.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, 11: 1-6, 2002. yield of *Bertholletia excelsa* stand in southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 211, p. 371-384. 2005.

ZUIDEMA, P. A. Demography and management of the nut tree (*Bertholletia excelsa*). PROMAB (Programa Manejo de Bosques de la Amazonia boliviana), **Scientific Series 6**, Riberalta, Bolivia. 2003.