SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CAMPUS DE NOVA XAVANTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES, AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Dipteryx alata* Vogel NO ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA

Rayleen Whaiti Lopes da Silva

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Dr. Joaquim Manoel da Silva

Nova Xavantina-MT
Outubro, 2021

SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CAMPUS DE NOVA XAVANTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES, AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Dipteryx alata* Vogel NO ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA

Rayleen Whaiti Lopes da Silva

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Dr. Joaquim Manoel da Silva

Nova Xavantina-MT
Outubro, 2021

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

This study was partially funded by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazilian Ministry of Education)

CIP – CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

S586d Silva, Rayleen Whaiti Lopes da.
Desenvolvimento de marcadores microssatélites, avaliação da diversidade e da estrutura genética de populações de *Dipteryx alata* Vogel no ecótono Cerrado-Amazônia / Rayleen Whaiti Lopes da Silva – Nova Xavantina, 2021.
63 f.; 30 cm. (ilustrações) Il. color. (sim).

Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação *Stricto Sensu* (Mestrado Acadêmico) Ecologia e Conservação, Faculdade de Ciências Agrárias Biológicas e Sociais Aplicadas, Câmpus de Nova Xavantina, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2021.
Orientador: Dr. Joaquim Manoel da Silva.

1. Biblioteca Genômica. 2. Endogamia. 3. Heterozigosidade. 4. Loci. 5. Polimorfismo. I. Silva, Joaquim Manoel da, Dr. II.Título.

CDU 582.736.3

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário Luiz Kenji Umeno Alencar - CRB1 2037.

TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES, AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Dipteryx alata* Vogel NO ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA

Rayleen Whaiti Lopes da Silva

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Aprovada em 03 de março de 2021.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Joaquim Manoel da Silva (Orientador)
Universidade do Estado de Mato Grosso

Fernanda Ancelmo de Oliveira

Dra. Fernanda Ancelmo de Oliveira (Membro titular-Externo)
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes (Membro titular-Externo)
Instituto Federal do Ceará

Profa. Dra. Karina de Cassia Faria (Membro suplente)
Universidade do Estado de Mato Grosso

Profa. Dra. Mariana Araujo Barreto (Membro suplente)
Universidade Estadual de Campinas

Ao meu anjo e amado filho Luís Otávio, você é o que tenho de melhor e ao meu esposo Francisco Mauricio, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Joaquim Manoel da Silva, pela dedicação na orientação, paciência, pela confiança em mim depositada na realização deste trabalho e ensinamentos. Serei eternamente grata pelos incentivos.

Ao meu querido marido Francisco Mauricio e amado filho Luís Otávio, pelo carinho, dedicação, amor, compreensão (por minhas ausências durante a realização deste trabalho), incentivo, por nunca terem duvidado dos meus sonhos e sempre apoiaram minhas decisões. Amo vocês!

À minha família, avó, pai, mãe, tios, tias, irmãos, sobrinhos e demais parentes pelo amor, carinho, incentivo e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos Professores Dr. Ricardo Firmino e a Dra. Karina Faria por todo auxílio, sugestões e pelas colaborações na construção deste trabalho. À Prof. Dra. Fernanda A. de Oliveira pela disponibilidade em me ajudar em todos os momentos em que precisei, pela ajuda com os programas estatísticos, pelo carinho e amizade. Ao Msc. Geovani Luciano de Oliveira pelo auxílio imprescindível e pelas valiosas contribuições. Ao professor Dr. Ivandilson P. P. de Menezes pelas orientações, por disponibilizar seu tempo ouvindo minhas dúvidas e pelas orientações no desenvolvimento dessa dissertação.

Sou grata a minha amiga Sarah S. Machado pelo auxílio imprescindível nas coletas e no laboratório, pelo companheirismo, carinho, pela eterna amizade e principalmente por todos os bons momentos que passamos juntas, muito obrigada por ser essa pessoa tão especial.

Ao Marcos Vinicius S. Lima por toda ajuda nas coletas, você foi muito importante na construção desse trabalho, e principalmente pela amizade.

Aos meus amigos Wigis, Kelby, Bethânia e Elisama por todo auxílio no laboratório, muito obrigada pelos bate papos, pela amizade, brincadeiras e pelo carinho.

Ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas, coordenado pela Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, por ter me recebido durante o desenvolvimento de parte desse trabalho.

Sou grata aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuir com o trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT, *Campus* de Nova Xavantina, pela oportunidade e aos professores pelos ensinamentos e contribuição nessa minha jornada em busca de conhecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim a todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 1

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 4

CAPÍTULO 1 6

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Dipteryx alata* Vogel, ESPÉCIE DE MÚLTIPLO USO DO CERRADO BRASILEIRO 6

RESUMO 6

ABSTRACT 7

1. INTRODUÇÃO 8

2. MATERIAL E MÉTODOS 9

2.1. Extração de DNA, construção de biblioteca genômica enriquecida em SSR e análise das sequências 9

2.2. Validação da biblioteca e Caracterização dos loci microssatélites 11

2.3. Análise estatística dos loci microssatélites 12

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 12

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 20

CAPÍTULO 2 23

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE) NO ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES 23

RESUMO 23

ABSTRACT 24

1. INTRODUÇÃO 25

2. MATERIAL E MÉTODOS 26

2.1. Área de estudo 26

2.2. Coleta de dados 27

2.3. Extração do DNA de D. alata 29

2.4. Amplificação dos loci microssatélites 30

2.5. Análise de dados 32

3. RESULTADOS 32

4. DISCUSSÃO 39

5. CONCLUSÃO 44

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 44

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1. Distribuição das populações amostradas de *D. alata* nos munícipios de Nova Xavantina e Barra do Garças no estado de Mato Grosso.....11

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2

Figura 1. Populações amostradas de *D. alata* nos munícipios de Nova Xavantina e Barra do Garças no estado de Mato Grosso.....29

Figura 2. Representação gráfica do valor de ΔK para cada grupo (K) de acordo com as informações dos 10 loci SSR usando o webserver STRUCTURE HARVESTER.....36

Figura 3a. Representação dos 150 indivíduos das populações de *D. alata*. Barras verticais com coloração vermelho (grupo I), verde (grupo II), amarelo (grupo III) e azul (grupo IV) de acordo com o grupo genético ao qual pertencem.....37

Figura 3b. Representação dos 150 indivíduos das populações de *D. alata* com K= 3.....37

Figura 4. Relação genética entre os 150 indivíduos de *D. alata* determinada pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A coordenada 1 explicou 15,39% e a coordenada 2, 9,18% da variação dos dados.....39

Figura 5. Correlação entre distância genética e geográfica dos indivíduos de *D. alata*, teste de Mantel.....39

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 1

Tabela 1. Características dos dez loci microssatélites desenvolvidos para *D. alata*.....14

Tabela 2. Parâmetros genéticos dos loci microssatélites determinados em três populações de *D. alata*.....17

Tabela 3. Estimativas de parâmetros genéticos de sete loci microssatélites desenvolvidos para *D. alata*.....18

Tabela 4. Desequilíbrio de ligação entre pares de loci microssatélites de *D. alata*.....19

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 2

Tabela 1. Localização geográfica das áreas amostradas com as populações de *D. alata*, código das populações, número de amostras, coordenadas geográficas, elevação da área, diâmetro à altura do peito médio (DAP) e coeficiente de variação (CV), nos munícipios de Nova Xavantina e Barra do Garças-MT. NA - população não possuía DAP.....27

Tabela 2. Marcadores microssatélites utilizados e detalhes de amplificação por PCR, indicando a temperatura de anelamento (TA °C), fluorescência do primer (marcação).....31

Tabela 3. Microssatélites com alelos privados (Ap) e suas frequências nas populações de *D. alata*.....33

Tabela 4. Índices de diversidade genética para as populações *D. alata* caracterizadas a partir de dez marcadores microssatélites. Em que: *N*: tamanho da amostra; *Na*: número médio de alelos por locos para cada população; *Ne:* Número médio de alelos efetivos; *P%*: porcentagem de loci polimórficos para cada população; H_O: heterozigosidade média observada; H_E: heterozigosidade média esperada; *f:* coeficiente de endogamia ou índice de fixação de Wright (1978).....34

Tabela 5. Estimativa das estatísticas F de Wright, (F_{IS}) índice de fixação médio dentro da população; (F_{IT}) índice de fixação total. (F_{ST}) índice de fixação devido à subdivisão e o número de migrantes por geração (Nm) nas cinco populações de *D. alata* caracterizadas com 10 marcadores microssatélites, com (p= 0,005).....35

Tabela 6. Estimativas de divergência genética (F_{ST} - abaixo da diagonal) e probabilidade correspondente (p-valor < 0,05 – acima da diagonal) entre pares de cinco populações de *D. alata*, caracterizadas a partir de 10 marcadores microssatélites.....35
Tabela 7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as cinco populações de *D. alata* a partir da utilização de 10 loci microssatélites. Onde df = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrado médio e (p=0,005; 999 permutações).....36
Tabela 8. Proporção de afiliação dos indivíduos das populações pré-definidas nos quatro grupos encontrados pelo programa STRUCTURE.....37
Tabela 9. Proporção de afiliação dos indivíduos das populações pré-definidas nos três grupos encontrados pelo programa STRUCTURE.....37
Tabela 10. Estimativas de divergência genética (F_{ST} - abaixo da diagonal) e probabilidade correspondente (p-valor < 0,05 – acima da diagonal) entre pares baseados nos grupos formados pelo programa STRUCTURE.....38

RESUMO

O Cerrado ocupa uma vasta extensão do território brasileiro, por sua vez possui áreas de transição com os demais biomas possibilitando uma alta heterogeneidade de habitats. Dos ecótonos tropicais entre grandes biomas, destaca-se a maior área de transição do planeta, denominada Amazônia/Cerrado, esta é inserida na região conhecida "arco do desmatamento". Nestas áreas de transição é comum a presença da espécie *Dipteryx alata*, conhecida popularmente como baru, esta pertence à família (Fabaceae), e é amplamente distribuída por todo o bioma Cerrado. Indivíduos adultos dessa espécie podem atingir em média 15 metros de altura, possui uso múltiplo na indústria alimentar, com grande potencial para uso farmacêutico e madeireiro, além de ser considerado espécie chave, pois é apropriado para o cultivo e estabelecimento de mudas para a recuperação de áreas degradadas, apresentando altas taxas de germinação das sementes, exigindo baixas quantidades de adubação e proporcionando alimento no período de seca para a fauna. A variação genética presente em uma espécie, é o que a torna apta a sobreviver e se adaptar a possíveis mudanças do ambiente, dessa forma os estudos genéticos que quantificam a variabilidade genética existente dentro e entre as populações, são essenciais para construção de planos de conservação e manejo apropriado para as espécies e também para a preservação do ecossistema ao qual estão inseridas. Os marcadores codominantes microssatélites são eficientes em gerar informações sobre diversidade e estrutura genética de populações, mapeamento genético, caracterização da diversidade genética e mapeamento genético. A manutenção da diversidade genética é o principal propósito dos estudos de genética de populações, para assim, fornece alternativas que permitem a conservação e a preservação de espécies, auxiliando na elaboração de planos de manejo e conservação a longo prazo. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de novos marcadores microssatélites desenvolvidos para *D. alata*, assim como conhecer a diversidade e a estrutura genética de populações de *D. alata* em áreas de transição no bioma Cerrado. Portanto o presente estudo foi desenvolvido em duas etapas apresentadas em dois capítulos: no capítulo 1, utilizando a metodologia de construção de biblioteca genômica enriquecida com SSR, foi realizado o desenvolvimento, caracterização e diversidade genética de marcadores microssatélites inéditos, polimórficos e específicos para a espécie. No capítulo 2, os SSR desenvolvidos, juntamente com outros retirados da literatura, foram utilizados nas análises de diversidade e estrutura genética de cinco populações de *D. alata*, uma de unidade

de conservação, três naturais, porém modificadas e uma de área de reflorestamento pela técnica de plantio por meio de uma mistura de sementes nativas, contribuindo para o aumento da representatividade do genoma e também para conservação e uso da espécie.

Palavras-chave: biblioteca genômica, endogamia, heterozigosidade, loci, polimorfismo.

Abstract

The Cerrado occupies a vast expanse of Brazilian territory, and in turn has transition areas with other biomes, enabling a high heterogeneity of habitats. Of the tropical ecotones between large biomes, the largest transition area on the planet stands out, called Amazon/Cerrado, which is inserted in the region known as the "arc of deforestation". In these transition areas it is common the presence of the species Dipteryx alata, popularly known as baru, which belongs to the (Fabaceae) family and is widely distributed throughout the Cerrado biome. Adult individuals of this species can reach an average of 15 meters in height, has multiple uses in the food industry, with great potential for pharmaceutical and timber use, besides being considered a key species, because it is suitable for cultivation and establishment of seedlings for the recovery of degraded areas, with high rates of seed germination, requiring low amounts of fertilization and providing food in the dry season for wildlife. The genetic variation present in a species is what makes it able to survive and adapt to possible changes in the environment. Thus, genetic studies that quantify the genetic variability within and between populations are essential for the construction of conservation plans and appropriate management for the species and also for the preservation of the ecosystem in which they are inserted. The microsatellite codominant markers are efficient in generating information on diversity and genetic structure of populations, genetic mapping, characterization of genetic diversity and genetic mapping. The maintenance of genetic diversity is the main purpose of population genetics studies, and thus provides alternatives that allow the conservation and preservation of species, assisting in the development of long-term management and conservation plans. In this context, the objective of this work was to evaluate the genetic diversity of new microsatellite markers developed for *D. alata*, as well as to know the diversity and genetic structure of *D. alata* populations in transition areas in the Cerrado biome. Therefore, the present study was developed in two stages presented in two chapters: in chapter 1, using the methodology of building a genomic library enriched with SSRs, the development, characterization and genetic diversity of novel microsatellite markers, polymorphic and specific for the species, was carried out. In chapter 2, the SSRs developed, along with others taken from the literature, were used in the analysis of diversity and genetic structure of five populations of *D. alata*, one from a conservation unit, three natural, but modified, and one from a reforestation area using a native seed mixture planting technique, contributing to increase the representativeness of the genome and also for the conservation and use of the species.

Keywords: genomic library, inbreeding, heterozygosity, loci, polymorphism.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado ocupa uma vasta extensão do território brasileiro, com cerca de uma área de aproximadamente dois milhões de km^2 (CARDOSO et al., 2009). Localizado na porção central do país, o bioma Cerrado possui áreas de transição com os demais biomas possibilitando uma alta heterogeneidade de habitats (CARVALHO et al., 2013) e alta sazonalidade, que permite a ocupação de espécies diferentes, resultando na savana mais rica do mundo em termo de biodiversidade e gerando altas taxas de endemismo (KLINK; MACHADO, 2005).

Dos ecótonos tropicais entre grandes biomas, destaca-se a maior área de transição do planeta, a qual separa o Cerrado, a maior e mais diversa savana da Amazônia a maior floresta tropical do mundo (MARQUES et al., 2020). São áreas de grande importância para a conservação da biodiversidade global, porém essa área de transição Amazônia/Cerrado está inserida na região denominada “arco do desmatamento” (CARNEIRO et al., 2019).

As elevadas taxas de desmatamento e exploração inadequada dos recursos naturais pode acarretar a extinção de 397 espécies de plantas endêmicas até 2050 (STRASSBURG et al., 2017). A destruição das comunidades naturais vem sendo ocasionada pelo desmatamento, agricultura, pecuária, queimadas e extração de madeira (MARQUES et al., 2020), transformando extensas áreas e contínuas de vegetação natural em monoculturas, reflorestamentos monoespecíficos e pastagens (SANCHES; VILLAS-BÔAS, 2005).

Dentro da grande diversidade vegetal, a espécie frutífera do Cerrado *Dipteryx alata* Vogel destacam-se pelo seu elevado valor econômico, ambiental e social (TARAZI et al., 2010). O Barueiro pertence à família (Fabaceae), este é amplamente distribuído no bioma Cerrado, indivíduos adultos dessa espécie podem atingir em média 15 metros de altura (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004). É uma espécie múltiplo uso na indústria alimentar com grande potencial para uso na alimentação humana e animal, uso farmacêutico e madeireiro (CANUTO et al., 2008). O Baru é considerado espécie chave, pois é apropriado para o cultivo e estabelecimento de mudas para a recuperação de áreas degradadas, pois além de apresentar altas taxas de germinação das sementes, exige baixas quantidades de adubação e proporciona alimento no período de seca para a fauna (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004; SOUSA et al., 2018). O extrativismo inadequado do baru pode provocar a diminuição de suas populações naturais (CRUZ et al., 2011), nesse cenário, a exploração excessiva dessa espécie economicamente e biologicamente importante resultará na destruição de seus

recursos genéticos, causando erosão desses e até mesmo, de entrarem em processo de extinção (GOMES; MOURA, 2010).

A variação genética presente em uma espécie, é o que a torna apta a sobreviver e se adaptar a possíveis mudanças do ambiente (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006). Estudos genéticos que quantificam a variabilidade genética existente dentro e entre as populações, são essenciais para construção de planos de conservação e manejo apropriado para as espécies e também para a preservação do ecossistema ao qual estão inseridas (OLIVEIRA et al., 2006).

Um dos diversos métodos para a avaliar da variabilidade genética das populações é o uso de marcadores codominantes Simple Sequence Repeat (SSR) ou microssatélites, os quais, permitem a distinção entre genótipo homozigoto do heterozigoto (LIRA; CARDOSO; FERREIRA, 2006). Tais marcadores de DNA apresentam distribuição aleatória no genoma de eucariotos e, geralmente, são caracterizados por possuírem sequências simples, contendo de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* (OLIVEIRA et al., 2006); ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Os SSRs são marcadores moleculares adequados e eficientes em gerar informações de diversidade genética, e ainda têm sido utilizados em diversos estudos como em Berti et al., (2017), Dantas et al., (2019), Santos et al., (2020), Rocha et al., (2020), apresentando informações sobre a genética de populações, mapeamento genético, caracterização da diversidade genética, mapeamento genético, estudos de genética de população, estudos evolutivos e filogenética.

O estudo de genética de populações fornece alternativas que permitem a conservação e a preservação de espécies, auxiliando na elaboração de planos de manejo, conservação a longo prazo e exploração equilibrada (GOMES; MOURA, 2010). Por isso a conservação das espécies e do ambiente, é importante para a manutenção da variabilidade genética, visto que, algumas espécies não possuem seu genoma bem representado (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

Apesar dos vários trabalhos disponíveis, esse estudo procura caracterizar a diversidade genética do Baru visando aumentar a representatividade de seu genoma. Dessa forma estruturamos a dissertação em dois capítulos: o primeiro capítulo, “Desenvolvimento, caracterização e diversidade genética de novos marcadores microssatélites para *Dipteryx alata* Vogel, espécie de múltiplo uso do Cerrado Brasileiro”. Nesta primeira etapa, objetivou-se desenvolver e caracterizar um conjunto de loci microssatélites a partir da construção de uma biblioteca genômica enriquecida com SSR. Neste sentido buscou avaliar se a estratégia de desenvolvimento de iniciadores a partir de biblioteca genômica enriquecida

com microssatélites foi eficiente na detecção de diferentes tipos de regiões microssatélites para o desenvolvimento de primers em Baru; quais dos pares de primers desenvolvidos apresentaram padrão de amplificação com bandas únicas, nítidas e bem definidas; qual nível de informação de polimorfismo ou de diversidade genética dos loci microssatélites; e quantos e quais marcadores microssatélites disponibilizados para Baru foram adequados para estudos genéticos populacionais da espécie. No segundo capítulo, "Diversidade e estrutura genética de populações de *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) no ecótono Cerrado-Amazônia utilizando marcadores microssatélites", teve como proposta avaliar a variabilidade genética entre e dentro de cinco populações de *D. alata*, com uso de marcadores microssatélites; efetuar caracterização da diversidade e estrutura genética dessa espécie arbórea nas cinco regiões; além de avaliar a importância dessas populações para a conservação dos recursos genéticos, de forma a subsidiar o manejo e conservação do Baru.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTI, C. L. F. et al. Diversidade genética de populações naturais de Dipteryx alata localizadas nos municípios de Brasilândia/MS, Indiara/GO e Itarumã/GO estimada por marcadores microssatélites. **Revista Cultura Agronômica**, v. 26, n. 2, p. 203–216, 1 abr. 2017.

CANUTO, D. S. DE O. et al. Variabilidade genética de populações naturais de Dipteryx alata Vog. por meio de caracteres nutricionais em sementes. Genetic variability of natural populations of Dipteryx alata Vog. by nutrients seeds content. **Revista do Instituto Florestal**, 2008.

CARDOSO, E. et al. Mudanças fitofisionômicas no cerrado: 18 anos de sucessão ecológica na estação ecológica do panga, Uberlândia - MG / CHANGES IN CERRADO VEGETATION PHYSIOGNOMIES: 18 YEARS OF ECOLOGICAL SUCCESSION AT ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO PANGA, UBERLÂNDIA - MG. **Caminhos de Geografia**, v. 10, n. 32, 2009.

CARNEIRO, K. M. S. et al. Estoque e perda de necromassa da vegetação lenhosa em um gradiente fitofisionômico na transição Amazônia-Cerrado. **Rodriguésia**, v. 70, 2019.

CARVALHO, M. B. et al. Floristic and phytosociology in a physiognomic gradient of riverine forest in Cerrado, Campinas, SP. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 3, p. 110–120, set. 2013.

CRUZ, K. S. DA et al. Partial characterization of proteins from baru (Dipteryx alata Vog) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 11, p. 2006–2012, 2011.

DANTAS, L. G. et al. Development of ten microsatellite markers for Alibertia edulis (Rubiaceae), a Brazilian savanna tree species. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 4, p. 4593–4597, 1 ago. 2019.

GOMES, C. C.; MOURA, T. Estrutura Genética em Populações de Plantas do Cerrado. **Revista Agrotecnologia - Agrotec**, v. 1, p. 33–51, 31 dez. 2010.

KLINK, C.; MACHADO, R. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, 1 jan. 2005.

LIRA, C.; CARDOSO, M.; FERREIRA, P. Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação. Use of microsatellite markers in conservation biology studies. **Floresta & Ambiente**, v. 13, p. 25–36, 20 out. 2006.

MARQUES, E. Q. et al. Redefining the Cerrado–Amazonia transition: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 5, p. 1501–1517, 1 abr. 2020a.

MARQUES, E. Q. et al. Redefining the Cerrado–Amazonia transition: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 5, p. 1501–1517, 1 abr. 2020b.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294–307, 2006.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253–260, 1 jan. 2006.

ROCHA, L. F. et al. Development and characterization of nuclear microsatellite markers for Eremanthus erythropappus and their transferability across related species. **Biological Research**, v. 53, n. 1, p. 30, 7 jul. 2020.

SANCHES, R. A.; VILLAS-BÔAS, A. Planejando a gestão em um cenário socioambiental de mudanças: o caso da bacia do rio Xingu. **Brazilian Journal of Public Administration**, v. 39, n. 2, p. 365 a 380–365 380, 1 jan. 2005.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. DE. Baru: biologia e uso. 2004.

SANTOS, S. K. S. et al. Transferibilidade de marcadores SSR, diversidade e estrutura genética em Syagrus oleracea / Transferibility of SSR markers, diversity and genetic structure in Syagrus oleracea. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 59931–59947, 20 ago. 2020.

SOUSA, F. F. DE et al. NUTRITIONAL REQUIREMENTS OF Dipteryx alata SEEDLINGS GROWN UNDER NUTRIENTLIMITING CONDITIONS. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 102–114, mar. 2018.

STRASSBURG, B. B. N. et al. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1–3, 23 mar. 2017.

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

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2002.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Dipteryx alata* Vogel, ESPÉCIE DE MÚLTIPLO USO DO CERRADO BRASILEIRO

A ser submetido para publicação no periódico *Molecular Biology Reports*

RESUMO

O Barueiro (*Dipteryx alata*) é uma planta arbórea, frutífera e nativa do Bioma Cerrado de importante impacto socioeconômico. Este trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar novos loci microssatélites para *D. alata*. A partir do desenvolvimento de biblioteca genômica enriquecida em microssatélites, foram sintetizados dez pares de primers. Destes, sete foram polimórficos, fornecendo um total de 49 alelos, com média de 5 a 5,57 alelos por loco. Um expressivo conteúdo de informação polimórfica foi obtido, como indicado pelo valor médio da heterozigosidade esperada (*HE*), com média total de 0,58 a 0,65 por loco. O valor médio da heterozigosidade observada (*Ho*) também foi alto, com média total de 0,73 a 0,85 por loco. Alguns dos loci estão em desequilíbrio de ligação como o (Dalat G6 com o Dalat B3, H3 e B4), além do (Dalat B4 com B5). A estimativa dos loci combinados para a probabilidade de exclusão de paternidade obteve valor médio de 1,00 para todos os loci, e a probabilidade de identidade média da análise combinada os valores foram de ($1,2^{10\wedge-5}$) a ($4,4^{10\wedge-6}$). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os marcadores desenvolvidos para *D. alata* são informativos e adequados para estudos de diversidade genética e estrutura populacional, visando a conservação e manejo da espécie.

Palavras-chave: Barueiro. Variabilidade genética. Marcadores moleculares. Primers. SSRs.

ABSTRACT

Baru tree (*Dipteryx alata*) is an arboreal, fruitful plant native to the Cerrado Biome with an important socioeconomic impact. This study aimed to identify and characterize new microsatellite loci for *D. alata*. From the development of a genomic library enriched in microsatellites, ten pairs of primers were synthesized. Of these, seven were polymorphic, providing a total of 49 alleles, with an average of 5 to 5.57 alleles per locus. A significant content of polymorphic information was obtained, as indicated by the average expected heterozygosity (*HE*), with a total average of 0.58 to 0.65 per locus. The average value of the observed heterozygosity (*Ho*) was also high, with a total average of 0.73 to 0.85 per locus. Some of the loci are in linkage disequilibrium, such as Dalat (G6 with B3, H3 and B4), in addition to Dalat (B4 with B5). The estimate of the combined loci for the probability of paternity exclusion obtained an average value of 1.00 for all loci, and the average combined probability of identity, the values were ($1.2^{10\wedge-5}$) to ($4.4^{10\wedge-6}$). The results obtained here show that the markers developed for *D. alata* are informative and suitable for studies on genetic diversity and population structure, aiming at the conservation and management of the species.

Keywords: Baru tree. Genetic variability. Molecular markers. Primers. SSRs.

1. INTRODUÇÃO

A destruição das comunidades naturais tem representado um iminente cenário de extinção de espécies, no qual o Cerrado (savana brasileira) está inserido, o qual sofre excessiva pressão antrópica devido à expansão agropecuária [1]. A compreensão de padrões da maneira pela qual a variabilidade genética está organizada nas populações, é de fundamental importância para a elaboração de estratégias de conservação e uso sustentável das espécies e de seus habitats [2].

D. alata, conhecida popularmente como "Baru", é uma espécie arbórea nativa que possui múltiplos usos que vão desde a alimentação humana e de animais, até suas propriedades farmacêuticas [3]. Esta também é bastante utilizada na recuperação de áreas degradadas, pois favorece o enriquecimento de nutrientes no solo devido à alta produção de massa foliar (PEREIRA; PASQUALETO; PASQUALETO, 2011). O Baru é uma espécie bastante promissora devido as múltiplas possibilidades de uso que possui, características como, alta taxa de geminação e facilidade no estabelecimento de mudas, a torna apropriada para o cultivo, pois além de realizar a manutenção do bioma, quando utilizadas na recuperação de áreas degradadas, consequentemente, beneficiam a conservação do meio ambiente e a preservação da espécie, possibilitando também a geração de renda local (Soares, Chaves, Telles, et al. 2008, Oliveira et al. 2017, Pinho et al. 2018, Batista & Sousa 2019).

É uma espécie endêmica do bioma Cerrado, e devido sua ampla distribuição por toda a área e abundância em vários de seus habitats [4], apresenta potencial como modelo para verificar o impacto da intervenção antrópica sobre o ambiente, por meio da caracterização da sua diversidade e estrutura genética e do tamanho efetivo das populações [2]. Para isso, os marcadores microssatélites (SSR- Single Sequence Repeats) são considerados ótimas ferramentas para acessar a variabilidade genética das populações [5]. Os SSRs possuem elevado grau de polimorfismo, as unidades repetitivas da sequência são flanqueadas por sequências únicas, o que lhes permitem serem amplificadas individualmente através de reação em cadeia através da polimerase (PCR), além de serem multialélicos e ter alta reprodutibilidade[6]. Desta forma, este marcador viabiliza informações sobre a história evolutiva de longo prazo das espécies, mutação, isolamento da população, assim como os mecanismos de deriva genética, fluxo gênico e seleção [6].

Apesar da importância do Barueiro para o Cerrado, pouco se sabe sobre a variabilidade genética existente nas populações [3-7, 8]. Embora marcadores SSR específicos já estejam disponíveis [7-8], esses estudos demonstram baixo nível de polimorfismo nos loci, limitando o tipo de estudo que podem ser realizados. Assim, visando aumentar a cobertura de loci representativos do genoma, desenvolvemos e caracterizamos um conjunto de novos loci microssatélites para *D. alata*. Estes marcadores apresentam potencial para utilização em estudos populacionais em várias escalas, a fim de oferecer subsídios para a conservação e manejo da espécie e de sua área de ocupação. Diante do exposto, as principais perguntas são: 1. A estratégia de desenvolvimento de iniciadores a partir de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites será eficiente na detecção de diferentes tipos de regiões microssatélites para o desenvolvimento de primers em Baru? 2. Quais dos pares de primers desenvolvidos para os loci microssatélites, apresentarão padrão de amplificação com bandas únicas, nítidas e bem definidas? 3. Qual o nível de informação de polimorfismo ou de diversidade genética dos loci microssatélites identificados para o Baru? 4. Quantos e quais marcadores microssatélites disponibilizados para Baru serão adequados para estudos genéticos populacionais da espécie?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração de DNA, construção de biblioteca genômica enriquecida em SSR e análise das sequências

Para a extração do DNA genômico foram utilizadas folhas jovens de um único indivíduo de *D. alata* coletadas no “Parque Municipal Mário Viana” Conservation Unit, located in the municipality of Nova Xavantina, state of Mato Grosso, Brazil. O DNA foi isolado utilizando o kit comercial Plant DNeasy® (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA foi utilizado para construir uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites de acordo com o protocolo adaptado de [9]. Aproximadamente 5 µg de DNA foi digerido usando a enzima de restrição *AfaI* (10u/µL) (Invitrogen) e os fragmentos digeridos foram ligados a adaptadores específicos Rsa21 (10µM) (5´ CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3’) e Rsa25 (10µM) (5´ TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3’). O enriquecimento foi baseado na captura

dos fragmentos de DNA contendo sequências microssatélites, através da hibridização de sondas com Biotina-IIIII (CT)8 e Biotina-IIIII (GT)8 e esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (MagneSphere Magnetic Separation Products; Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA). Os fragmentos capturados foram amplificados por PCR, com o primer do adaptador Rsa21 (10µM), clonados em um vetor pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) e, em seguida, inseridos em células competentes de *Escherichia coli* 10H10b por meio de eletroporação. Cultivamos as células competentes em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL), IPTG 20% (100mM) e X-galactosidase 2% (100 µg/ml).

Selecionamos 48 clones positivos usando triagem branco/azul, que foram sequenciados em ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) usando os primers T7 (5´-TAATACGACTCACTATAGG-3´) e SP6 (5´-ATTTAGGTGACACTATAGA-3´), e BigDye Terminator versão 3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer–Applied Biosystems).

Após a obtenção das sequências de *D. alata*, os cromatogramas foram analisados por meio do programa Chromas v.2.6.6 [10]. Com isso, arquivos do tipo 'FASTA' foram obtidos para cada clone individualmente, contendo apenas sequências de interesse e com boa qualidade. Foram retiradas das sequências as regiões correspondentes ao vetor e ao adaptador, restando apenas a sequência do inserto, onde a busca por sequência do vetor foi realizada usando a ferramenta VecScreen (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/). A obtenção das sequencias consenso (*contigs*) foi realizada através do software CAP3 ("CAP3 *sequence assembly*") [11], posteriormente os *contigs* foram alinhadas usando o banco de dados NCBI não redundante (Nr), por meio do algoritmo BLASTN [12] com um e- value cutoff of 1e-06 usando a ferramenta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

As regiões microssatélites foram identificadas através do SSRIT (The Simple Sequence Repeat Identification Tool) [13]. Essa ferramenta possibilita a localização de microssatélites perfeitos, tendo como critério para a seleção dos microssatélites a serem desenvolvidos, um número mínimo de três repetições para um grupo de até hexanucleotídeos. Os pares de primers foram desenhados utilizando o programa primer3Plus [14], com os seguintes parâmetros: tamanho máximo do primer de 25 pb, annealing temperature of the primer (Tm) variando de 52°C a 65°C, porcentagem de GC mínima de 40% e máxima de 60%, e faixa de produto de amplificação entre 100 e 700 pb.

2.2. Validação da biblioteca e Caracterização dos loci microssatélites

Para validar a biblioteca de microssatélites, foram utilizados um total de 90 indivíduos de *D. alata*, amostrados de três populações na região de transição Cerrado-Amazônia (Figura 1), foram coletados 30 indivíduos de cada população: 1) população "BASC"- população natural, com histórico de antropização, localizada no município de Nova Xavantina - MT (14° 67' 78.5" S 52° 54' 36.6" W), onde os indivíduos adultos estão distribuídos em uma área de pastagem; 2) população "BAP"- é uma população conservada, inserida no Parque Municipal do Bacaba (14° 70' 82.7" S 52° 35' 31.9" W); 3) população "BAVC"- é uma população jovem, situada em uma área de restauração realizada pela técnica de semeadura direta manual, localizada no município de Barra de Garças - MT (14°87' 64.0" S 52°11' 81.4" W) (Figura 1).

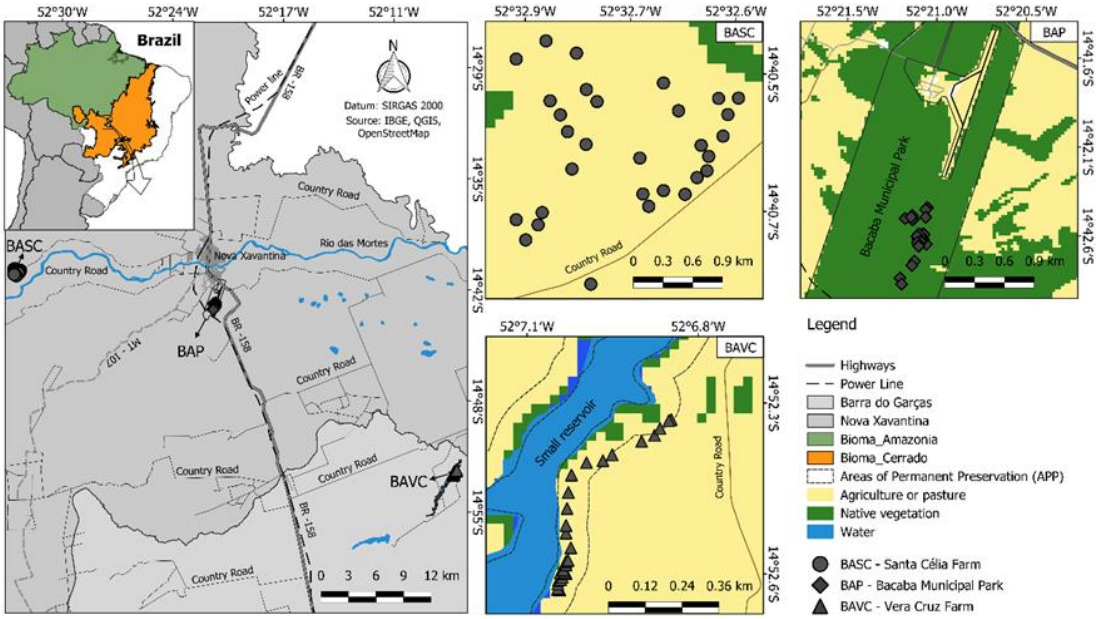

Figura 1. Distribuição das populações amostradas de *D. alata* nos munícipios de Nova Xavantina e Barra do Garças no estado de Mato Grosso.

O DNA genômico total foi extraído de folhas jovens usando o método de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) [15]. A PCR foi realizada em volumes de 20 µL usando o termociclador Biocycler®, cada coquetel continha aproximadamente 20ng de DNA

genômico, contendo 2,0 µL de 10x PCR *Buffer*, 0,60 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 1,6 µL de DNTPs (0,2 mM cada), 0,40 µL de cada primer (0,20 µM), 1 U de Taq DNA Polimerase, 4,0 µL de DNA (5ng/µL) e 10.8 µL de H_2O miliQ. Para otimização da temperatura de anelamento dos pares de primers, a amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador Biocycler®, obedecendo aos passos descritos por [16]. Os produtos de PCR foram inicialmente analisados em géis de agarose 2%, em TBE 1X (Tris base 0,1 M; ácido bórico 1 M e EDTA 0,5 M), corado com gel red (1:500 µL) e visualizados sob luz ultravioleta. Somente os pares de primers que amplificaram em uma temperatura de anelamento específica e apresentaram tamanhos de fragmentos dentro do intervalo esperado, foram utilizados para caracterização dos loci. Os loci foram submetidos ao sistema multiplex, no qual o primer forward foi marcado com uma das seguintes fluorescências (FAM, NED, VIC e ATTO565) e, analisados em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com recomendações do fabricante.

2.3. Análise estatística dos loci microssatélites

Para genotipagem dos loci, os alelos foram pontuados contra o GeneScan-600 (LIZ) Size Standard Kit interno (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando o software Geneious 8.1.6 [17]. Estatísticas descritivas foram geradas usando o software GenAlex Analysis 6.5 [18], no qual foram avaliados as estimativas de número de alelos por loco (*Na*), heterozigosidade observada (*Ho*), heterozigosidade esperada (*He*) e índice de fixação (*f*) e a probabilidade de identidade (*PI*) e exclusão (*PE*). O programa FSTAT 2.9.3.2 [19] foi usado para analisar o desequilíbrio de ligação entre os loci.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 48 clones sequenciados 23% das sequências continham regiões de microssatélites. A eficiência na porcentagem de sequências obtidas com a construção da biblioteca genômica foi também observada no protocolo de [9], a qual, variou de 20 a 90% para espécies de plantas tropicais. Porém com base nos estudos de diversidade genética realizados para *D. alata* [7- 8], esse é o primeiro a desenvolver marcadores SSRs a partir da técnica de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites, a qual produz fragmentos predominantemente compostos por sequências repetitivas.

A partir dos pares de primers desenhados, um conjunto de 10 loci foram selecionados para síntese e validação (Tabela 1). Após a otimização, foram definidas as temperaturas de anelamento para os dez loci, em 58°C ou 60°C (Tabela 1), os quais apresentaram padrão amplificação claro, com bandas únicas e bem definidas. Destes, sete loci foram polimórficos e dois foram monomórficos nas populações avaliadas.

Tabela 1 Características dos dez loci microssatélites desenvolvidos para *D. alata.*

Loci	Sequências de primers (5′–3′)	Motivo	Amplitude alélica	Ta (°C)	Marcação	Multiplex	Nº de acesso do GenBank
DalatA1	F:GCCTTATCCGCAAACTAACG R: AAGCCATTTGTTGCAACTGA	$(GA)_{10}$	406	60 °C	FAM	A	MZ229345
DalatB3	F:TGCAACTTGAAACACGTCTT R: ACAAGTCGCAAAGGTTTCTT	$(GT)_8$	528-530	58 °C	VIC	A	MZ229346
DalatB4	F:CGTTTGCACACACTTAAAAC R: GGGCTGAATTTGAAAGCACT	$(AC)_7$	554-586	60 °C	NED	A	MZ229347
DalatB5	F:TAGACAGAGACCCAGAGACC R: TCTGGTGAGCTTTTATGTGT	$(GT)_{10}$	362-382	60 °C	ATTO565	A	MZ229348
DalatC3	F:ACCTATATGCTGCTAGCTCA R: GTCATGACCCTAAGCTTTAGC	$(GT)_7$	390-424	60 °C	VIC	B	MZ229349
DalatD6	F:TGGGGAGTTTTGAATTTGGTG R: ACAAGACAGCTGCATAGAAAG	$(TG)_7$	501	60 °C	NED	B	MZ229350
DalatF3	F:AGAAAGCAACATGAGTCTGTG R: ACATATCTGCCATTACGCCT	$(CT)_{14}$	558	60 °C	ATTO565	B	MZ229351
DalatF6	F:ACCACCTGTTACACTTGCAA R: TCCACTTCCATCACTTCTCT	$(AC)_{12}$	288-310	58 °C	FAM	C	MZ229352
DalatG6	F:TTGGGTGATTTTGATGGTTGG R: GTTCTACCCTCTGACACTCG	$(TG)_5$	480-506	60 °C	VIC	C	MZ229353
DalatH3	F:TGGGTGATTTTGATGGTTGG R: CACCTCTACCTCCCCTAGAG	$(TG)_5$	512-538	60 °C	NED	C	MZ229354

Ta(°C)= Temperatura de anelamento estabelecida após testes de otimização.

Um total de 49 alelos foi identificado nos sete loci polimórfcios, com o número de alelos por loco variando de dois para o loco (Dalat B3) a doze no loco (Dalat B4) (Tabela 2). A média total de alelos, nas três populações variou de 5 a 5,57 alelos por loco (Tabela 2). Essa variação no número de alelos por loco é comum em regiões microssatélites devido aos altos níveis de polimorfismo encontrado nesses marcadores [20], o que está diretamente relacionado às grandes taxas de mutação que ocorrem nessas regiões [21].

A heterozigosidade observada variou de 0,00 a 1,0 por loci dependendo da população amostrada, e a heterozigosidade esperada variou de 0,34 a 0,74 por loci, com médias totais variando de 0,73 a 0,85 para H_O e de 0,58 a 0,65 para H_E (Tabela 2). A heterozigosidade observada (H_O) foi maior do que a heterozigosidade esperada (H_E) para a maioria dos loci, exceto para os loci (Dalat B3 e B4). O maior valor de heterozigotos observados sugere um excesso de heterozigotos em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse excesso de heterozigotos pode estar ocorrendo devido as características do sistema reprodutivo da espécie ou até por uma seleção a favor dos heterozigotos para a *D. alata* [22].

O índice de fixação (*f*), foi negativo para a maioria dos loci, exceto para os loci (Dalat B3 e B4), com médias totais variando de -0,15 a -0,28 (Tabela 3). Quando essa estimativa possui índices próximos ou menores do que zero indica a ocorrência de acasalamento entre indivíduos não aparentados [23].

Foram estimadas a probabilidade de identidade (*PI*) de cada loco, o qual variou de 0,12 (Dalat B4, C3 e F6) a 0,75 (Dalat B3), com estimativas médias da análise combinada nos valores variando de ($1,2^{10\wedge-5}$) a ($4,4^{10\wedge-6}$). A probabilidade de exclusão de paternidade (*PE*) baseada nos sete pares de loci microssatélites variou de 0,12 para o loco (Dalat B3) a 0,70 para o loco (Dalat B4), na análise combinada, onde nenhum parental é conhecido, o valor médio foi de 1,00 para todos os loci (Tabela 3). O conjunto de marcadores microssatélites apresentou uma baixa probabilidade de identidade (*PI*) combinada, indicando a probabilidade de se encontrar, ao acaso, dois indivíduos de uma amostra com o mesmo genótipo em um determinado conjunto de marcadores é mínima [24]. Já a probabilidade de exclusão por meio da análise combinada para os loci SSRs desenvolvidos foi alta, fornecendo alta confiabilidade para se excluir corretamente um indivíduo da paternidade [25]. Os sete loci SSR foram suficientes para distinguir entre os

noventa indivíduos, indicando que o conjunto de marcadores microssatélites é eficiente na discriminação de indivíduos em populações [24].

Tabela 2 Parâmetros genéticos dos loci microssatélites determinados em três populações de *D. alata*.
N= número de indivíduos analisados, *Na*= número de alelos observados, H_O= heterozigosidade observada, H_E = heterozigosidade esperada.

Loci	**Fazenda Santa Célia (BASC)**				**Parque do Bacaba (BAP)**				**Fazenda Vera Cruz (BAVC)**			
	N	N_A	H_O	H_E	*N*	N_A	H_O	H_E	*N*	N_A	H_O	H_E
DalatF6	29	5	0,93	0,72	30	6	0,97	0,74	30	8	0,97	0,71
DalatC3	30	7	1,00	0,72	29	4	1,00	0,67	30	7	0,97	0,73
DalatG6	30	4	1,00	0,66	30	3	1,00	0,57	30	3	1,00	0,63
DalatB3	26	2	0,00	0,40	26	2	0,00	0,14	26	2	0,00	0,46
DalatH3	29	5	1,00	0,63	29	5	1,00	0,66	30	5	1,00	0,67
DalatB4	30	8	1,00	0,71	30	9	0,83	0,66	26	5	0,31	0,34
DalatB5	30	8	1,00	0,70	30	6	0,93	0,63	29	8	0,90	0,71
Média	29,14	5,57	0,85	0,65	29,14	5,00	0,82	0,58	28,71	5,43	0,73	0,61
SE	0,55	0,84	0,14	0,04	0,55	0,87	0,14	0,07	0,71	0,90	0,15	0,06

Tabela 3 Estimativas de parâmetros genéticos de sete loci microssatélites desenvolvidos para *D. alata*.
F: índice de fixação *PI*: probabilidade de identidade genética, *PE*: probabilidade de exclusão paternidade e médias de análise combinada (*)

Loci	**Fazenda Santa Célia (BASC)**			**Parque do Bacaba (BAP)**			**Fazenda Vera Cruz (BAVC)**		
	f	*PI*	*PE*	*f*	*PI*	*PE*	*f*	*PI*	*PE*
DalatF6	-0,31	0,13	0,65	-0,33	0,12	0,67	-0,38	0,13	0,68
DalatC3	-0,41	0,12	0,69	-0,52	0,17	0,59	-0,34	0,12	0,69
DalatG6	-0,54	0,18	0,57	-0,79	0,29	0,39	-0,60	0,21	0,49
DalatB3	1,00	0,45	0,25	1,00	0,75	0,12	1,00	0,40	0,27
DalatH3	-0,60	0,21	0,51	-0,54	0,18	0,56	-0,52	0,17	0,59
DalatB4	-0,43	0,12	0,70	-0,28	0,15	0,66	0,09	0,45	0,33
DalatB5	-0,45	0,14	0,64	-0,51	0,20	0,54	-0,28	0,13	0,68
Média	-0,25	$4,4^{10^{\wedge -6}}$*	1,00*	-0,28	$2,4^{10^{\wedge -5}}$*	1,00*	-0,15	$1,2^{10^{\wedge -5}}$*	1,00*
SE	0,21	-	-	0,22	-	-	0,21	-	-

De acordo com o teste de desequilíbrio de ligação, verificou-se que a maioria dos loci segregam independentemente, não havendo associação significativa entre eles, com exceção apenas para os pares de loci (Dalat G6 X Dalat B3, Dalat G6 X Dalat H3, Dalat G6 X Dalat B4 e Dalat B4 X Dalat B5), para os quais o desequilíbrio de ligação foi significativo mesmo após a correção de Bonferroni (α= 0,0023809524) (Tabela 4). Os marcadores desenvolvidos para *D. alata* poderão ser usados em estudos de estrutura, diversidade genética, estrutura genética espacial, mapeamento e estudos de parentesco [26].

Tabela 4 Desequilíbrio de ligação entre pares de loci microssatélites de *D. alata*.

	Dalat F6	Dalat C3	Dalat G6	Dalat B3	Dalat H3	Dalat B4	Dalat B5
Dalat F6	-	0,29224	0,24833	0,88476	0,10876	0,50705	0,50376
Dalat C3	-	-	0,19157	0,48395	0,87276	0,75062	0,66348
Dalat G6	-	-	-	0,00019*	0,00043*	0,00043*	0,05476
Dalat B3	-	-	-	-	0,15795	0,09981	0,32557
Dalat H3	-	-	-	-	-	0,35319	0,07900
Dalat B4	-	-	-	-	-	-	0,00005*
Dalat B5	-	-	-	-	-	-	-

Nota: p-valor representa a probabilidade de desequilíbrio genotípico após 21000 permutações de alelos entre indivíduos. Valores significativos (*) após aplicação da correção de Bonferroni: p = 0,0023809524 (α = 0,05).

Os marcadores microssatélites desenvolvidos apresentam expressivo poder de discriminação e de diversidade gênica. Portanto, estes novos loci adicionados ao número de marcadores SSRs disponíveis para espécie *D. alata* contribuirá para uma maior amostragem aleatória do genoma e, consequentemente, estimativas da variabilidade genética com maior precisão, cooperando de forma mais efetiva para conservação desta espécie.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Batista FO, Sousa RS de (2019) compostos bioativos em frutos pequi (caryocar brasiliense camb.) E baru (dipteryx alata vogel) e seus usos potenciais: uma revisão / Bioactive compounds in fruits pequi (caryocar brasiliense camb.) E baru (dipteryx alata vogel) and their potential uses: a review. Brazilian Journal of Development 5:9259–9270. https://doi.org/10.34117/bjdv5n7-120

2. Santos SKS, Ortega JR, Rocha GP, et al (2020) Transferibilidade de marcadores SSR, diversidade e estrutura genética em Syagrus oleracea / Transferibility of SSR markers, diversity and genetic structure in Syagrus oleracea. Brazilian Journal of Development 6:59931–59947. https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-417

3. Soares TN, Chaves LJ, Telles MP de C, et al (2008) Distribuição espacial da variabilidade genética intrapopulacional de Dipteryx alata. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43:1151–1158. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000900008

4. Canuto DS de O, Silva AM da, Moraes MA de, et al (2008) Variabilidade genética de populações naturais de Dipteryx alata Vog. por meio de caracteres nutricionais em sementes. Genetic variability of natural populations of Dipteryx alata Vog. by nutrients seeds content. Revista do Instituto Florestal

5. Cosson P, Decroocq V, Revers F (2014) Development and characterization of 96 microsatellite markers suitable for QTL mapping and accession control in an Arabidopsis core collection. Plant Methods 10:2. https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-2

6. Allendorf FW (2017) Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. Molecular Ecology 26:420–430. https://doi.org/10.1111/mec.13948

7. Soares TN, Melo DB, Resende LV, et al (2012) Development of microsatellite markers for the neotropical tree species Dipteryx alata (Fabaceae). American Journal of Botany 99:e72–e73. https://doi.org/10.3732/ajb.1100377

8. GuimarÃ£es RA, Telles MPC, Antunes AM, et al (2017) Discovery and characterization of new microsatellite loci in Dipteryx alata Vogel (Fabaceae) using next-generation sequencing data. Genetics and Molecular Research 16:. https://doi.org/10.4238/gmr16029639

9. Billotte N, Lagoda PJL, Risterucci A-M, Baurens F-C (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits (1978) 54:277–288

10. Goodstadt L, Ponting CP (2001) CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication. Bioinformatics 17:845–846. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.9.845

11. Huang X, Madan A (1999) CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. Genome Res 9:868–877. https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868

12. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25:3389–3402. https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389

13. Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, et al (2001) Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (Oryza sativa L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential. Genome Res 11:1441–1452. https://doi.org/10.1101/gr.184001

14. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, et al (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Research 35:W71–W74. https://doi.org/10.1093/nar/gkm306

15. Doyle J (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW (eds) Molecular Techniques in Taxonomy. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 283–293

16. Soares TN, Melo DB, Resende LV, et al (2012) Development of microsatellite markers for the neotropical tree species Dipteryx alata (Fabaceae). American Journal of Botany 99:e72–e73. https://doi.org/10.3732/ajb.1100377

17. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28:1647–1649. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199

18. Peakall R, Smouse PE (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6:288–295. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

19. GOUDET J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices (version 2.9.3). http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm

20. Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics 5:435–445. https://doi.org/10.1038/nrg1348

21. Gao C, Ren X, Mason AS, et al (2013) Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. Functional Plant Biol 40:645–661. https://doi.org/10.1071/FP12325

22. Gomes CC, Moura T (2010) Estrutura Genética em Populações de Plantas do Cerrado. Revista Agrotecnologia - Agrotec 1:33–51. https://doi.org/10.12971/2179-5959.v01n01a03

23. Santos JF, Mariguele KH, Pereira A, et al (2020) Parâmetros genéticos e teste de paternidade em progênies de Euterpe oleracea produto da hibridação espontânea com Euterpe edulis em clima subtropical. Revista de la Facultad de Agronomía 119:036–036. https://doi.org/10.24215/16699513e036

24. Val ADB do, Breves S de S, Cançado GM de A, et al (2020) Use of molecular markers SSR and SCAR for identification of olive accessions. Bioscience Journal 36:. https://doi.org/10.14393/BJ-v36n4a2020-47959

25. Rocha LL da, Martinez AM, Delgado JV, et al (2018) Painel SRT para teste de paternidade em caprinos. Med Vet (UFRPE) 12:52–61. https://doi.org/10.26605/medvet-v12n1-2160

26. Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES (2003) Structure of Linkage Disequilibrium in Plants. Annual Review of Plant Biology 54:357–374. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Dipteryx alata* VOGEL (FABACEAE) NO ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

A ser submetido para publicação no periódico *Biodiversity and Conservation*

RESUMO

Muitas atividades antrópicas, como o desmatamento, agricultura, pecuária e urbanização, podem afetar negativamente a biodiversidade do Cerrado. A intensa fragmentação do Cerrado ocasionada pelas atividades humanas, provoca o declínio das populações biológicas, a perda de diversidade genética, a perda de habitat e a extinção de espécies. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética entre e dentro de cinco populações de *D. alata,* espécie nativa do Cerrado com uso de marcadores microssatélites, de forma a subsidiar o manejo e conservação da espécie. Foram avaliados dez loci de microssatélites em 150 indivíduos, amostrados em cinco populações. A diversidade genética das populações estudadas foi verificada através do número de alelos (média de 5,36), heterozigosidade observada (média de 0,82) e heterozigosidade esperada com média de (0,62). Sendo assim, a diversidade genética foi considerada alta, onde mais de 90% está distribuída dentro das populações. Foi encontrada uma correlação positiva significativa entre as distâncias genética e geográficas dos grupos de indivíduos nos fragmentos (r=0,310, p=0,001). No entanto, através da observação dos valores de F_{ST} foi evidenciada uma diferenciação genética moderada entre as populações, reafirmada pelas análises do programa STRUCTURE, que indicou haver dois níveis de estruturação, sendo ele de três a quatro agrupamentos na amostragem, sugerindo que essas populações naturais eram estruturadas no passado como uma população continua.

Palavras-chave: agrupamento, Cerrado, fragmentação, fluxo gênico.

ABSTRACT

Many anthropic activities, such as deforestation, agriculture, cattle ranching and urbanization, can negatively affect the biodiversity of the Cerrado. The intense fragmentation of the Cerrado caused by human activities causes the decline of biological populations, loss of genetic diversity, habitat loss, and species extinction. The objective of this work was to analyze the genetic variability between and within five populations of *D. alata*, a native species of the Cerrado, using microsatellite markers in order to support the management and conservation of the species. Ten microsatellite loci were evaluated in 150 individuals, sampled in five populations. The genetic diversity of the populations studied was verified through the number of alleles (mean of 5.36), observed heterozygosity (mean of 0.82) and expected heterozygosity with a mean of (0.62). Thus, genetic diversity was considered high, where more than 90% is distributed within populations. A significant positive correlation was found between genetic and geographical distances of the groups of individuals in the fragments (r=0.310, p=0.001). However, through the observation of the FST values a moderate genetic differentiation between populations was evidenced, reaffirmed by the analyses of the STRUCTURE program, which indicated that there were two levels of structuring, being three to four clusters in the sampling, suggesting that these natural populations were structured in the past as a continuous population.

Keywords: clustering, Cerrado, fragmentation, gene flow.

1. INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado ocupa uma vasta extensão do território brasileiro garantindo a elevada diversidade de ecossistemas, de espécies biológicas e de endemismos (KLINK; MACHADO, 2005). A degradação dos ecossistemas pelas atividades antrópicas, como o desmatamento, agricultura, pecuária e urbanização, afeta negativamente a biodiversidade desse bioma (SANTOS; CRISTO; MOREIRA, 2019). A intensa fragmentação do Cerrado ocasionada pelas atividades humanas, provoca o declínio das populações biológicas, a perda de diversidade genética, a perda de habitat e a extinção de espécies (STRASSBURG et al., 2017).

Conhecido por conter uma das mais ricas e diversas floras do mundo, nele se encontra cerca de 11.627 espécies de plantas vasculares superiores nativas (MENDONÇA et al., 2008), entre elas encontramos a espécie *Dipteryx alata* Vogel, amplamente distribuída na vegetação nativa do Cerrado e em áreas de transição Cerrado-Amazônia (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004). Popularmente conhecida como Baru, esta espécie possui características socioeconomicamente e ambientalmente desejadas, como a produção de sementes comestíveis com elevado potencial nutritivo (CRUZ et al., 2011; BATISTA; SOUSA, 2019). Além de sua rápida germinação de sementes e crescimento da muda, favorecendo a sua inserção em plantios de recuperação e restauração de áreas degradadas (BONI et al., 2016; SOUSA et al., 2018; BATISTA; SOUSA, 2019). Mesmo o Barueiro possuindo grande importância essa árvore típica do Cerrado está ameaçada de extinção (CARRAZZA; D' ÁVILA, 2010), pois apesar de existir leis de proteção à flora, elas são ignoradas pela maioria dos agricultores (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006), (DIAS; FERREIRA, 2017). A compreensão de padrões da maneira pela qual a variabilidade genética está organizada nas populações é de fundamental importância para a elaboração de estratégias de conservação e uso sustentável dessa espécie e de seu habitat (BATISTA; SOUSA, 2019b).

A diversidade genética presente nas espécies é essencial para que elas se adaptem às constantes mudanças ambientais e se mantenham ao longo do tempo, pois diferentes fatores ecológicos, ambientais e mecanismos microevolutivos afetam a estrutura genética das populações naturais (FAJARDO et al., 2018). Estudos sobre genética de populações avaliam os padrões de variabilidade genética das espécies e produzem informações sobre a persistência das populações locais (TELLES et al., 2010) e quais fatores as moldam (NAVARRO et al., 2010).

A avaliação da variabilidade genética das populações com os marcadores microssatélites, permitem a distinção entre genótipo homozigoto do heterozigoto (VIEIRA et al., 2016). Geralmente os microssatélites são caracterizados por possuírem sequências simples, contendo de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* (VIEIRA et al., 2016).

Os marcadores microssatélites são frequentemente utilizados para fornecer estimativa de parâmetros de diversidade e estrutura genética de populações (GOIS et al., 2018). A compreensão dos padrões de distribuição da diversidade genética das populações de Baru é de fundamental importância para a elaboração de estratégias de conservação do bioma e da espécie, além de contribuir para seu uso de forma sustentável (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar a variabilidade genética entre e dentro de cinco populações de *D. alata*, espécie nativa do Cerrado com uso de marcadores microssatélites, assim como avaliar a estrutura e a diversidade genética de cada uma, de forma a subsidiar o manejo e conservação da espécie. Cogitando-se as seguintes hipóteses: 1. Quando estimada a variabilidade genética entre e dentro das populações de *D. alata*, haverá maior variabilidade genética dentro das populações; 2. O nível de diversidade genética é similar nas populações de *D. alata*; 3. Ao caracterizar a diversidade e a estrutura genética das populações, comprova-se que o método de reflorestamento mantém a representatividade da variabilidade existente na natureza.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

As coletas foram realizadas nos municípios de Barra do Garças e Nova Xavantina no estado de Mato Grosso, as quais, foram intituladas com códigos, sendo elas BAF, BAP, BAS, BASC e BVC. Foram coletadas um total de 30 amostras de cada população, assim como os dados de coordenadas geográficas, elevação da área, diâmetro à altura do peito médio (DAP) e coeficiente de variação (CV) foram retirados de cada indivíduo (Tabela 1).

Esses municípios estão inseridos em uma região de transição entre os biomas Cerrado e Floresta Amazônica (MARQUES et al., 2020), composta pela vegetação predominante cerrado *sensu stricto*, seguidos por áreas de matas, cerradão, mata de galeria e cerrado rupestre, caracterizado por solos do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo (MARIMON

JUNIOR; HARIDASAN, 2005). O clima da região é do tipo Aw conforme a classificação de Köppen, possuindo dois períodos bem definidos, um período seco e outro chuvoso, com precipitação média anual de 1.500 mm a 1.528 mm, e temperatura média anual de 25ºC a 25,5°C (MARIMON et al., 2010), (PIRANI; SANCHEZ; PEDRONI, 2009).

Tabela 1. Localização geográfica das áreas amostradas com as populações de *D. alata*, código das populações, número de amostras, coordenadas geográficas, elevação da área, diâmetro à altura do peito médio (DAP) e coeficiente de variação (CV), nos munícipios de Nova Xavantina e Barra do Garças-MT. NA - população não possuía DAP.

Município	**População**	**Código**	**Número de amostras**	**Coordenadas**		**Elevação**	**DAP**	**CV**
				Longitude (W)	**Latitude (S)**	**(m)**	**(cm)**	**%**
Nova Xavantina-MT	**Chácara Furnas**	**BAF**	30	52,33711	14,69933	274-334	79.07	35
	Parque do Bacaba	**BAP**	30	52,352472	14,708361	304-356	37,03	69
	Proximidades do córrego Salgadinho	**BAS**	30	52,391583	14,714528	287-344	96,73	53
	Fazenda Santa Célia	**BASC**	30	52,54401	14,67834	281-317	134,1	36
Barra do Garças-MT	**Fazenda Vera Cruz**	**BAVC**	30	52,11807	14,87642	260-302	NA	NA

2.2. Coleta de dados

As amostragens foram realizadas em quatro populações naturais de *D. alata* no munícipio de Nova Xavantina e em uma população de plantio de semeadura direta no município de Barra do Garças no estado de Mato Grosso, dessa forma foram amostradas cinco populações, totalizando 150 indivíduos.

A população denominada BAP é uma população natural localizada no Parque Municipal do Bacaba, Unidade de Proteção Integral desde 1992, esta foi utilizada como referência, de forma, a avaliar o impacto das áreas de pastagens sobre a variabilidade genética nas populações. Os indivíduos de BAP foram amostrados ao longo de uma trilha, sendo ela inserida, em fitofisionomias de cerradão, cerrado sentido restrito e cerrado rupestre, porém essa população é composta por indivíduos mais jovens conforme mostra a

(Tabela 1) esta possui o menor DAP entre o conjunto de populações amostradas em áreas naturais.

Já a população BAF está localizada próximo ao Parque Municipal do Bacaba em área privada (Chácara Furnas) e de pequenos fragmentos de vegetação. Os indivíduos amostrados nessa região encontram-se distribuídos ao longo da pastagem destinada a criação de bovino, sendo esta, fragmentada por estrada particular e pela BR 158.

A população BAS, é afastada da zona urbana do município, sendo ela também inserida em meio a pastagem. Os indivíduos foram amostrados ao longo da estrada principal, interligando várias fazendas da região, que em grande parte estavam presentes fragmentos de vegetação do tipo cerrado sentido restrito.

BASC é uma população localizada em área privada (Fazenda Santa Célia), no qual, os indivíduos estão dispostos ao longo da pastagem. É uma área destinada a criação de gado com pequenos fragmentos de Cerrado, sendo a fitofisionomia predominante de cerrado sentido restrito. A fazenda Santa Célia é parceira a anos da The Nature Conservancy e o Grupo Roncador, assim desenvolvem em sua propriedade ações de intensificação sustentável da pecuária, com técnicas que permitem produzir uma maior quantidade de gado mantendo a mesma área de pasto, consequentemente evitando o avanço do desmatamento, minimizando perdas causadas por manejo inadequado das pastagens e compensando as emissões de carbono.

A última população amostrada foi denominada BAVC, esta é situada no município de Barra do Garças, em área privada (Fazenda Vera Cruz), sendo ela, uma população jovem de reflorestamento, obtida por meio da técnica de plantio direto de várias sementes de diferentes espécies. A área reflorestada é circundada por pastagem, destinada a pecuária de corte desde 1970, além de contar com a presença de um grande lago artificial, onde os indivíduos coletados estavam dispostos ao longo de sua margem.

O mapa com as distribuições das populações foi construído com auxílio do programa Quantum GIS (QGIS) v. 3.0.0 (2018) (Figura 1). Para a realização do estudo foram coletadas amostras foliares de 30 indivíduos adultos em cada uma das populações naturais, com a distância mínima entre indivíduos de 50 metros, já na população de plantio as amostras foram coletadas aleatoriamente, visto que os indivíduos não possuíam esse distanciamento e as sementes utilizadas no plantio tem origem de casas de sementes de diferentes municípios. As amostras foliares em seguida foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e transportadas em caixas com gelo e armazenadas em freezer a -80ºC até o momento da extração do DNA.

Todos os indivíduos da espécie *D. alata* foram georreferenciados por um GPS portátil (eTrex Vista® HCx Part Number Garmin: 010-00630-00), o DAP de cada indivíduo foi retirado com auxílio de fita métrica (Tabela 1).

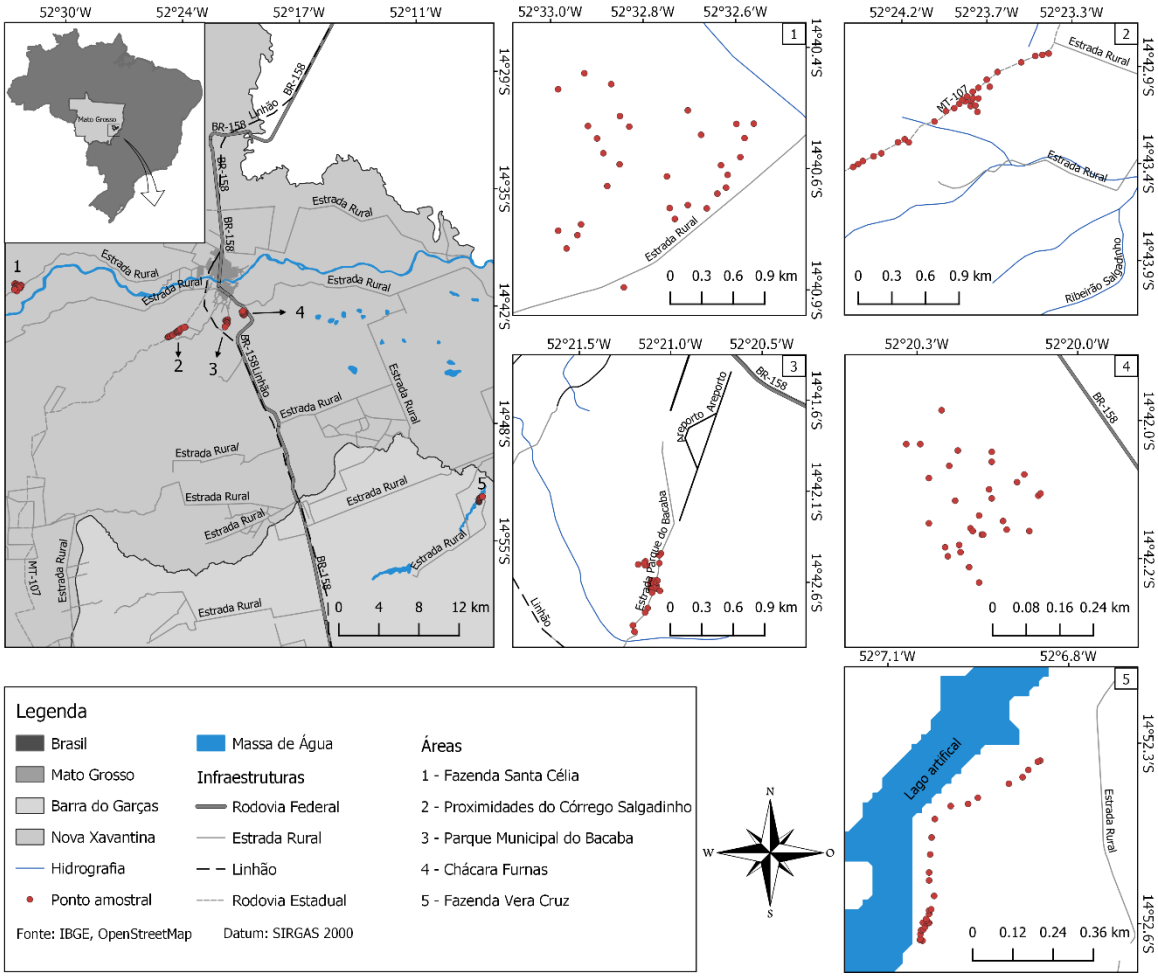

Figura 1. Populações amostradas de *D. alata* nos munícipios de Nova Xavantina e Barra do Garças no estado de Mato Grosso.

2.3. Extração do DNA de D. alata

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, localizado na da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, Campus de Nova Xavantina. Para a extração do DNA, foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (1990), que consiste no uso do tampão CTAB 2% (2% CTAB; 1,3 M NaCl; 0,2% 2-β-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40), pré-aquecido a 65 ºC em banho-maria. O DNA isolado foi ressuspenso em 195,5 µL de tampão TE (Tris-HCl 10

mM pH 8.0 e EDTA 1 mM) e 4,5 µL de RNAse por amostra, este DNA concentrado foi armazenado a -20 até o momento da reação da polimerase em cadeia (PCR).

O DNA obtido foi quantificado por meio de um microespectrofotômetro modelo ND-3800-OD Nano DOT. Em seguida, visando uma padronização nas concentrações das amostras foram realizadas as diluições do DNA em água MilQ para 5 ng.μL^{-1}.

2.4. Amplificação dos loci microssatélites

Foram utilizados sete marcadores microssatélites de *D. alata* desenhados e validados por Silva et al., (2021) dois pares de primers SSR desenvolvidos para *Dipteryx odorata* e validados por Vinson et al., (2009) e transferidos para *D. alata* por Tarazi et al., (2010) e um par primer desenvolvidos e validados por Soares et al., (2012) para *D. alata* (Tabela 2).

A PCR foi realizada em volume final de 20 µL para cada amostra, contendo 2,0 µL de 10x PCR Buffer, 0,60 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 1,6 µL de DNTPs (0,2 mM cada), 0,40 µL de cada primer (0,20 µM), 0,20 µL de Taq DNA Polimerase (5u/µL), 4,0 µL de DNA (5ng/µL) e 10.8 µL de H_2O miliQ. A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada no termociclador Biocycler®, obedecendo aos seguintes passos: 1º) Desnaturação do DNA a 94ºC por cinco minutos; (2º) 94°C por um minuto; (3º) temperatura específica de anelamento do par de primer ao fragmento de DNA durante um minuto; (4º) Extensão da molécula pela enzima Taq DNA polimerase a 72°C por um minuto; (5°) 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passo; (6°) Passo final de extensão de sete minutos a 72°C (SOARES et al., 2012).

A fim de confirmar a amplificação dos fragmentos, os produtos de PCR foram primeiramente avaliados por eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, por aproximadamente 3 horas a 100 volts, imerso em TBE 1X (Tris base 0,1 M; ácido bórico 1 M e EDTA 0,5 M), e corado com gel red (1:500 µL). O marcador 100 pb DNA ladder (Invitrogen) foi utilizado como referência para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. Os fragmentos amplificados no gel foram identificados por meio da visualização das bandas em luz ultravioleta (UV) com auxílio do Software GelCapture em um fotodocumentador MiniBIS Pro de imagem.

Posteriormente, foi realizado à montagem das placas para o sistema de genotipagem multiplex, para tanto foi elaborada uma reação composta de quatro marcadores SSR contendo diferentes fluorescências, denominadas FAM, NED, VIC e ATTO565 (Tabela 2).

Tabela 2. Marcadores microssatélites utilizados e detalhes de amplificação por PCR, indicando a temperatura de anelamento (TA °C), fluorescência do primer (marcação).

Locus	Sequências de primers *(forwards)* (5′–3′)	Sequências de primers (*reverse*) (5′–3′)	Amplitude alélica	Ta (°C)	Marcação	Nº de acesso ao GenBank
DalatB3[1]	TGCAACTTGAAACACGTCTT	ACAAGTCGCAAAGGTTTCTT	526 - 554	58 °C	VIC[A]	MZ229346
DalatB4[1]	CGTTTGCACACACTTAAAAC	GGGCTGAATTTGAAAGCACT	554 - 586	60 °C	NED[A]	MZ229347
DalatB5[1]	TAGACAGAGACCCAGAGACC	TCTGGTGAGCTTTTATGTGT	362 - 394	60 °C	ATTO565[A]	MZ229348
DalatC3[1]	ACCTATATGCTGCTAGCTCA	GTCATGACCCTAAGCTTTAGC	391 - 423	60 °C	VIC[B]	MZ229349
DalatF6[1]	ACCACCTGTTACACTTGCAA	TCCACTTCCATCACTTCTCT	288 - 310	58 °C	FAM[C]	MZ229352
DalatG6[1]	TTGGGTGATTTTGATGGTTGG	GTTCTACCCTCTGACACTCG	466 - 506	60 °C	VIC[C]	MZ229353
DalatH3[1]	TGGGTGATTTTGATGGTTGG	CACCTCTACCTCCCCTAGAG	512 - 538	60 °C	NED[B]	MZ229354
DO24[2]	AACGCAGGATCTAGCCAAAA	CTTCTCGCTGTTGTGCACTC	168 - 182	58 °C	NED[C]	AY535417
DO25[2]	AAATGCAAAACGGAAGAGGA	CCCCTGAAGGAGACTTCGAT	174 - 210	56 °C	ATTO565[B]	AY535418
DaE12[3]	CCTTCTATGCGCTCTCTGCT	TACTTCAACGCCAGCTTCCT	212 - 224	60 °C	FAM[B]	JN602069

[1]Primers desenvolvidos por Silva et al., (2021); [2] Primers desenvolvidos por Vinson et al., (2009); [3] Primers desenvolvidos por Soares et al., (2012). Multiplex [(**A**, **B** e **C**)].

2.5. Análise de dados

As amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com recomendações do fabricante. A análise dos eletroferogramas foi realizada no software Geneious versão 8.1.6 (KEARSE et al., 2012). Para determinar o tamanho dos alelos, foi utilizado como referência o marcador GeneScan-600 (LIZ) Size Standard Kit interno (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A partir da análise dos eletroferogramas, foram estimadas frequências alélicas e os índices de diversidade genética como, número de alelos por locos (*Na*), heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), índice de fixação (*f*). Além disso, foram estimadas as estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1950), Nm e Rst, as quais foram obtidas pelo software GenAlex Analysis 6.5.(PEAKALL; SMOUSE, 2012) A Análise de Variância Molecular (AMOVA) também foi obtida por meio do programa GenAlEx versão 6.5 [26].

Para o estudo da estrutura genética nas populações de *D. alata*, foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), (FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003) o qual permite inferir o número de grupos (K), que melhor explica os dados por meio de um método de agrupamento Bayesiano. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: 200.000 passos de burn-in e 500.000 interações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC) com variações de K de 1 à 10 e cada simulação foi replicada 20 vezes como recomendado (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). O webserver STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012) foi utilizado para determinar o valor de ΔK mais provável conforme critérios propostos por (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

3. RESULTADOS

A genotipagem dos 150 indivíduos de *D. alata* detectou 80 alelos nos dez loci analisados. Entre os alelos identificados, 20 (25%) foram privados ou exclusivos, ou seja, observados em uma única população (Tabela 3). A população como o maior número de alelos privados foi a BAF com nove alelos (Tabela 3).

Tabela 3. Microssatélites com alelos privados (Ap) e suas frequências nas populações de *D. alata*.

Populações	Alelos raros	Loci	Ap	Frequência alélica
BASC	03	DalatB5	370	0,017*
			392	0,017*
			394	0,017*
BAS	0	DaE12	224	0,052
BAP	01	DalatG6	482	0,050*
BAF	06	DalatC3	411	0,117
			413	0,050*
		DalatG6	466	0,018*
			490	0,018*
		DalatB3	526	0,079
			554	0,026*
		DO24	182	0,017*
		DO25	178	0,121
			180	0,017*
BAVC	04	DaE12	220	0,650
			222	0,083
		DalatF6	308	0,017*
		DalatB4	568	0,038*
			582	0,038*
		DO25	174	0,017*

* = alelos raros ($f \leq 0,05$)

Todos os loci foram polimórficos, apresentando média total de 5,36 alelos por loco nas cinco populações. O número médio de alelos (*Na*) observado por loci para cada população variou de 5,20 para as populações (BAS, BAP e BAVC) a 5,80 para população (BAF) (Tabela 8). O número médio de alelos efetivos (*Ne*) dos loci para cada população variou de 2,73 para população (BAP) a 3,29 para população (BASC), apresentando uma média total de 2,98. O fato do número efetivo de alelos (*Ne*) ser praticamente a metade de (*Na*) em todas as populações, indica que, apesar dos loci serem altamente polimórficos, há muitos alelos em baixa frequência. A porcentagem de loci polimórficos foi de 100% para todas as populações (Tabela 4).

Os valores médios de heterozigosidade observada (H_O) para cada uma das populações analisadas, foram altos e maiores que os valores de heterozigosidade esperada

(H_E) para todas as populações. A H_O variou de 0,71 para a população (BAVC) a 0,88 para população (BASC) indicando que a maior proporção dos loci estão em heterozigose. As estimativas de heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,60 para as populações (BAS e BAP) a 0,66 para a população (BASC). O valor médio geral de H_O para as cinco populações em dez loci foi de 0,82 e H_E foi de 0,62. Os índices de fixação ou coeficiente de endogamia médio (*f*) por população variou de -0,12 para população (BAVC) a -0,36 para a população (BAS), com média geral de -0,29 (Tabela 4). Reafirmando a alta proporção de heterozigotos na amostragem para todas as populações, as quais apresentaram índices negativos.

Tabela 4. Índices de diversidade genética para as populações *D. alata* caracterizadas a partir de dez marcadores microssatélites. Em que: *N*: tamanho da amostra; *Na*: número médio de alelos por locos para cada população; *Ne:* Número médio de alelos efetivos; *P%*: porcentagem de loci polimórficos para cada população; H_O: heterozigosidade média observada; H_E: heterozigosidade média esperada; *f:* coeficiente de endogamia ou índice de fixação de Wright (1978).

Populações	***N***	***Na***	***Ne***	***P%***	H_O	H_E	***f***
BASC	29,40	5,40	3,29	100	0,88	0,66	-0,31
BAS	29,70	5,20	2,87	100	0,86	0,60	-0,36
BAP	29,40	5,20	2,73	100	0,84	0,60	-0,33
BAF	27,50	5,80	3,12	100	0,83	0,63	-0,33
BAVC	29,20	5,20	2,88	100	0,71	0,61	-0,12
Média total	29,04	5,36	2,98	100	0,82	0,62	-0,29
SE total	0,28	0,33	0,18	0	0,04	0,02	0,07

Para estimativas das estatísticas F de Wright no conjunto de cinco populações, foram utilizados três coeficientes, o coeficiente de endogamia ou índice de fixação intrapopulacional (F_{IS}) com valor de -0,26 (F_{IT}) índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações com -0,19 e (F_{ST}) índice de fixação ou coeficiente de endogamia entre populações com 0,05 (Tabela 5). Além de estimar o número de migrantes por geração (Nm), sendo ele de 4,17 (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativa das estatísticas F de Wright, (F_{IS}) índice de fixação médio dentro da população; (F_{IT}) índice de fixação total. (F_{ST}) índice de fixação devido à subdivisão e o número de migrantes por geração (Nm) nas cinco populações de *D. alata* caracterizadas com 10 marcadores microssatélites, com (p= 0,005).

Parâmetros	Estimativas
(Fis)	-0,26
(Fit)	-0,19
(Fst)	0,05
(Nm)	4,17

A matriz de diferenciação genética entre populações, baseada no índice F_{ST} (Tabela 6), por pares de população revelou que a maior taxa de diferenciação genética foi entre as populações BAS e BAVC com (0,097), e que as populações mais similares foram BAP e BASC com (0,007).

Tabela 6. Estimativas de divergência genética (F_{ST} - abaixo da diagonal) e probabilidade correspondente (p-valor < 0,05 – acima da diagonal) entre pares de cinco populações de *D. alata*, caracterizadas a partir de 10 marcadores microssatélites.

	BASC	BAS	BAP	BAF	BAVC
BASC	0,000	0,004	0,134	0,009	0,001
BAS	0,042	0,000	0,004	0,002	0,001
BAP	0,007 ^{ns}	0,037	0,000	0,002	0,001
BAF	0,031	0,047	0,046	0,000	0,001
BAVC	0,062	0,097	0,070	0,082	0,000

^{ns} Não significativo

A análise da variância molecular (AMOVA) baseada na estatística F_{ST} entre as populações de *D. alata* revelou que 95% da variabilidade genética se encontra dentro das populações (intrapopulacional) e que 5% está entre as populações (interpopulacional) (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as cinco populações de *D. alata* a partir da utilização de 10 loci microssatélites. Onde df = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrado médio e (p=0,005; 999 permutações).

Fonte de variação	df	SS	MS	Estimativa de variação	Porcentagem (%)
Entre populações	4	55,923	13,981	0,179	5
Dentro das populações	295	954,133	3,234	3,234	95
Total	299	1010,057		3,413	100

A análise da estrutura populacional usando o software STRUCTURE e STRUCTURE HARVESTER permitiu estabelecer dois níveis de estruturação com três a quatro grupos distintos nas populações de *D. alata* analisadas (Figura 2).

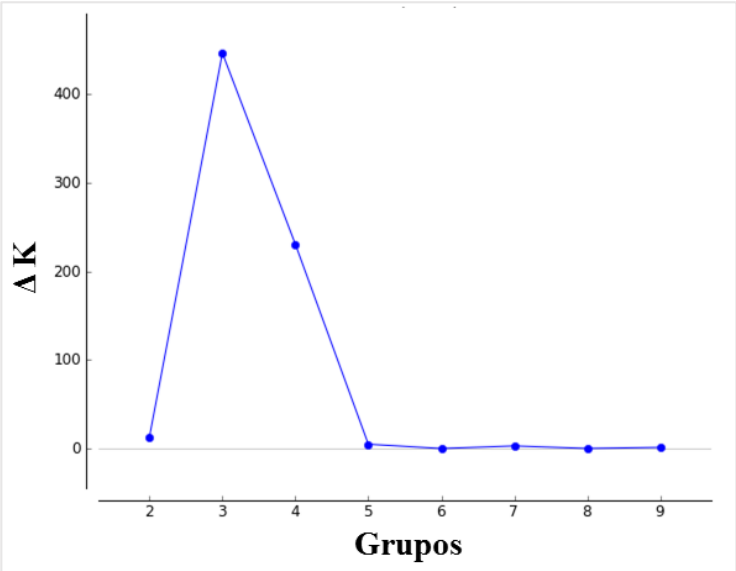

Figura 2. Representação gráfica do valor de ΔK para cada grupo (K) de acordo com as informações dos 10 loci SSR usando o webserver STRUCTURE HARVESTER.

Para os agrupamentos gerados pelo programa STRUCTURE, o valor ótimo escolhido para representar o conjunto de dados foi K=4, além de compara-lo também com K=3. De acordo com o resultado do webserver STRUCTURE HARVESTER com K=4, o grupo I (vermelho) reuniu 30 indivíduos, o grupo II (verde) 63, o grupo III (amarelo) 22 e o grupo IV (azul) com 28 indivíduos (Figura 3a e 3b) e (Tabela 8 e 9).

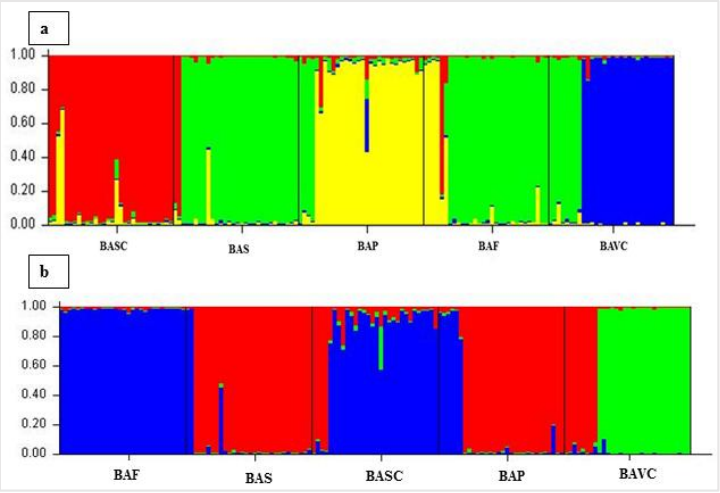

Figura 3a. Representação dos 150 indivíduos das populações de *D. alata*. Barras verticais com coloração vermelho (grupo I), verde (grupo II), amarelo (grupo III) e azul (grupo IV) de acordo com o grupo genético ao qual pertencem. **3b.** Representação dos 150 indivíduos das populações de *D. alata* com K=3.

Tabela 8. Proporção de afiliação dos indivíduos das populações pré-definidas nos quatro grupos encontrados pelo programa STRUCTURE.

Populações	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
BASC	0,915	0,013	0,006	0,066
BAS	0,070	0,895	0,006	0,030
BAP	0,032	0,149	0,019	0,800
BAF	0,041	0,781	0,007	0,171
BAVC	0,012	0,257	0,716	0,016

Tabela 9. Proporção de afiliação dos indivíduos das populações pré-definidas nos três grupos encontrados pelo programa STRUCTURE.

Populações	Grupo I	Grupo II	Grupo III
BASC	0,984	0,005	0,011
BAS	0,091	0,006	0,904
BAP	0,789	0,025	0,186
BAF	0,201	0,007	0,792
BAVC	0,015	0,723	0,263

Através dos resultados do STRUCTURE foi realizado a estimativa de diferenciação genética (F_{ST}) entre os grupos. Os grupos foram definidos pela proporção de afiliação (q>0,7) como na (Tabela 10).

Tabela 10. Estimativas de divergência genética (F_{ST} - abaixo da diagonal) e probabilidade correspondente (p-valor < 0,05 – acima da diagonal) entre pares baseados nos grupos formados pelo programa STRUCTURE.

	BASC	**BAS**	**BAP**	**BAF**	**BAVC**
BASC	0,000	0,015	0,001	0,087	0,401
BAS	0,017	0,000	0,001	0,013	0,380
BAP	0,110	0,128	0,000	0,001	0,001
BAF	0,012	0,019	0,133	0,000	0,364
BAVC	0,000	0,000	0,105	0,000	0,000

A análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 4), realizada independentemente dos resultados do programa STRUCTURE, indicou que os indivíduos podem ser agrupados em três grupos, corroborando os agrupamentos formados na (Figura 3b). A maior porcentagem de variação entre indivíduos pode ser explicada pela primeira coordenada da PCoA, 15,39%, seguida pela segunda componente, 9,18%, que, em conjunto com o segundo eixo da PCoA, representam cerca de 24,57% da variação total.

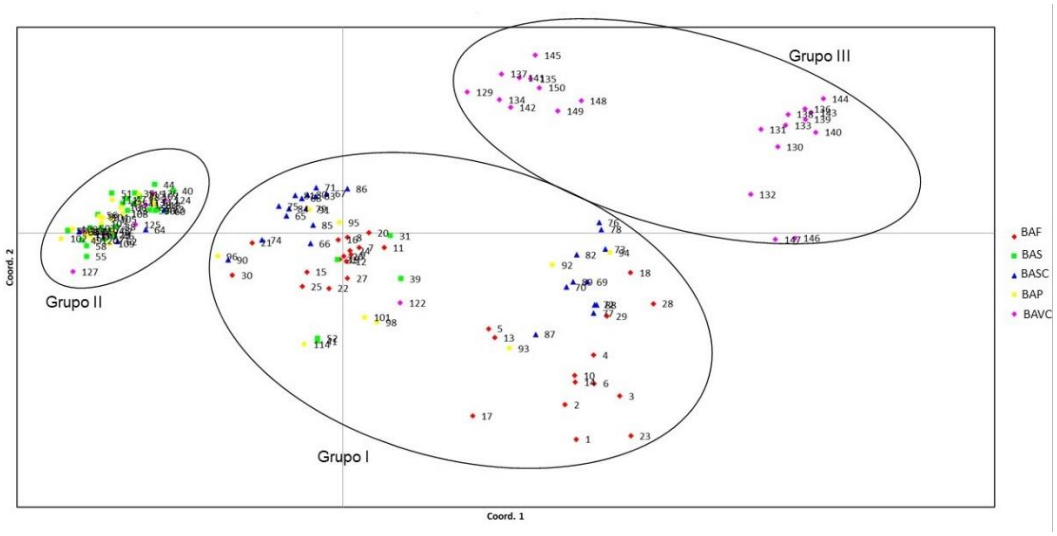

Figura 4. Relação genética entre os 150 indivíduos de *D. alata* determinada pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A coordenada 1 explicou 15,39% e a coordenada 2, 9,18% da variação dos dados.

Através da realização do teste de Mantel, foi permitida a verificação da existência de correlação positiva e significativa (r=0,310, p=0,001) entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas dos indivíduos amostrados (Figura 5).

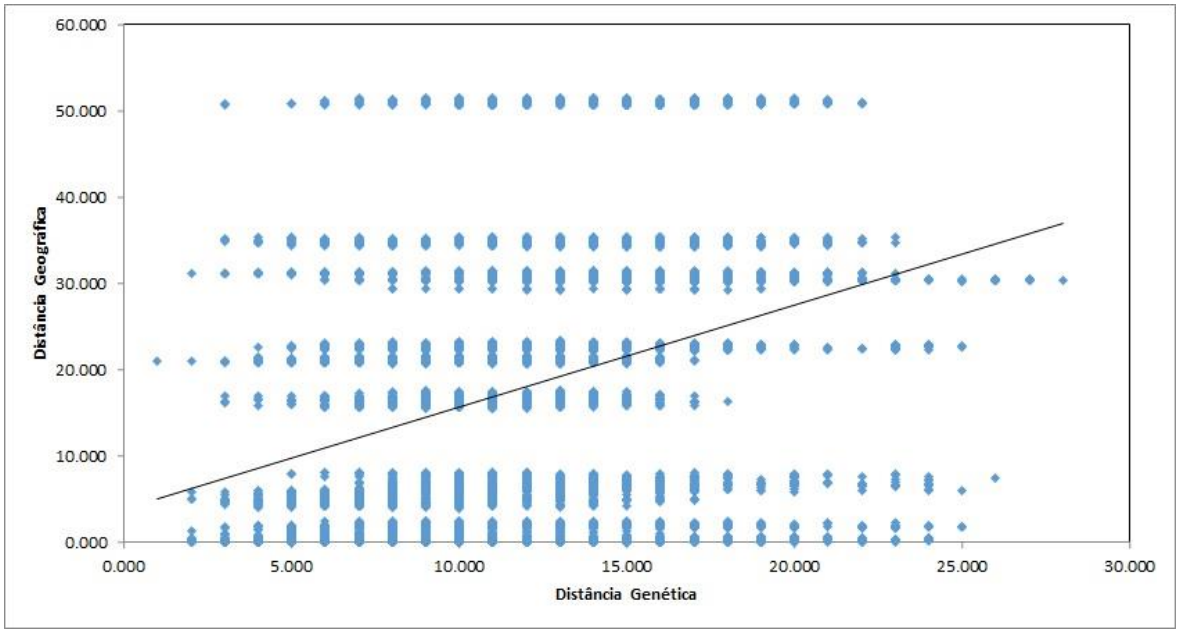

Figura 5. Correlação entre distância genética e geográfica dos indivíduos de *D. alata*, teste de Mantel.

4. DISCUSSÃO

A obtenção do alto número de alelos revelaram elevados índices de diversidade genética, visto que, os loci microssatélites são potencialmente multialélicos e possuem altas taxas evolutivas (OLIVEIRA et al., 2006). Por outro lado, a variação alélica detectada pode ser devido a uma característica da espécie, uma vez que, indivíduos adultos refletem a variabilidade que existia no passado, quando possivelmente essas populações eram maiores e conectadas. Assim, os resultados do número de alelos por loco do presente estudo, além de serem indicação de elevada diversidade genética, é uma importante estimativa na avaliação genética, já que quanto maior o número de alelos

presentes em uma população, maior é a sua diversidade (CABALLERO et al., 2010). O número médio de alelos encontrado neste trabalho foi superior àquele encontrado em outros estudos para *D. alata* como (TARAZI et al., 2010a) com média de 4,78 alelos por loco, (MELO et al., 2011) encontrou um número médio de alelos de 2,7 por loco, (DINIZ-FILHO et al., 2012a) com média de número de alelos de 2,83 por loco (GUIMARÃES, 2014) com média de 5,5 alelo por loco e (GUIMARÃES et al., 2017a) com 4,64 alelos por loco.

Os alelos privados observados nas cinco populações para os nove loci, atesta a necessidade de conservação da variabilidade genética ainda existente, pois indica que existe algum nível de isolamento entre essas populações (DINIZ-FILHO et al., 2012). Refletindo um fluxo gênico restrito, e evidenciando a importância da manutenção dessas populações, como a população BAF, para que não haja perda de alelos e consequente redução do nível de variabilidade genética. O número de alelos privados encontrados nessas populações, provavelmente está relacionado com o fato de as mesmas são compostas por árvores adultas isoladas em meio a pastagem. O indicativo de fluxo gênico restrito, pode ocasionar um aumento da divergência genética entre as populações (BOTREL et al., 2006).

Ao estimar o número de alelos que são igualmente frequentes em uma população ideal, observa-se que em todos os loci, o número de alelos (*Na*) foi maior que o número efetivo de alelos (*Ne*), confirmando a distribuição desigual das frequências alélicas, e a existência de um número elevado de alelos com baixa frequência, o que é comum em análises com microssatélites (RAPOSO et al., 2007).

Foi encontrada uma alta diversidade genética nas populações estudadas, onde pode-se observar altos índices nos parâmetros de heterozigosidade esperada. Porém a média de heterozigosidade observada foi maior que a esperada, sugerindo um excesso de heterozigotos em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (MORAES et al., 2020). O excesso de heterozigotos pode ser relacionada à ação de seleção, a qual favorece a manutenção de genótipos heterozigotos e sua aptidão e dificulta a fixação de homozigotos nos estádios iniciais da vida (HUFFORD; HAMRICK, 2003). Resultados como este também foram obtidos em outros trabalhos como (MOURA et al., 2009), que obteve valores de *Ho* 0,42 maior do que *He* 0,37 com a espécie do Cerrado *Solanum lycocarpum*, (ZUCCHI et al., 2002) com *Eugenia dysenterica* onde a *Ho* de 0,46 foi maior que *He* de 0,44. Em estudos com

D. alata, esses parâmetros foram menores que o encontrado no presente estudo, como no (DINIZ-FILHO et al., 2012b) foi observado *Ho* 0,36 e *He* 0,43, em (GUIMARÃES et al., 2017b) a heterozigosidade observada foi de 0,35 enquanto que *He* 0,51.

Os índices médios de endogamia (*f*) foram de valores baixos e negativos para todas as populações. Valores positivos *f* indicam uma deficiência de heterozigotos e valores negativos indicam excesso de heterozigotos (FURLAN et al., 2007) (SILVA et al., 2019), sendo assim o presente estudo indica alto nível de heterozigosidade o que pode ser confirmado pelos valores de H_O e H_E e baixa endogamia nas populações. Este resultado no coeficiente de endogamia (*f*) é influenciado pelos valores de *Ho*, onde os baixos valores de *f* e altos de H_O, apresenta relação com o tipo de reprodução dessa espécie, mostrando que a mesma se reproduz por alogamia obrigatória, possuindo auto-incompatibilidade de ação tardia e elevada taxa de aborto (OLIVEIRA; SIGRIST, 2008).

Os parâmetros das estatísticas F (F_{IS}, F_{IT} e F_{ST}) são os mais amplamente utilizados para descrever estrutura populacional (GOIS et al., 2018). A caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as cinco populações (F_{ST}) foi de 0,05 indicando uma ocorrência moderada de diferenciação genética, de acordo com (WRIGHT, 1978). A moderada divergência genética nos indivíduos adultos, pode ser resultado de um reflexo, um acontecimento passado, quando havia ligação entre as populações amostradas. Já os valores de F_{IS} e F_{IT} de -0,26 e -0,19 respectivamente, esses valores negativos e significativamente diferente de zero reafirmam o excesso de heterozigotos, essas são medidas dos desvios das proporções de Hardy-Weinberg dentro das subpopulações e na população total, respectivamente (RAMOS et al., 2021). Este resultado indica que nas populações analisadas os cruzamentos entre indivíduos seriam ao acaso, refletindo em pouca endogamia (GOLUNSKI et al., 2019). Avaliar o fluxo gênico entre populações permite estimar o número real de migrantes (Nm) por meio de F_{ST}. O alto número de migrantes (Nm= 4,17) por geração, não é um indicativo de estar havendo troca gênica, porém ele estima que pelo menos no passado o fluxo era suficiente para evitar diferenciação populacional devido à deriva. Outro fator importante que pode ter influenciado o elevado número de migrantes, é o fato que no conjunto de populações amostradas, possui uma população de reflorestamento (BAVC), onde as

sementes utilizadas nessa área são provenientes de no mínimo de três populações também aqui estudadas (BASC; BAS e BAF) e de demais localidades. A variação genética entre as populações é afetada pelo fluxo gênico, pois a introdução de novos genes provoca a redução da diferenciação genética entre as populações (HAMRICK, 2012).

Em concordância, o mesmo padrão foi exibido ao utilizar o índice F_{ST} para testar a diferenciação em pares entre as populações. Em geral, os valores mostraram diferenciação genética moderada para as populações com características de reprodução alógama (GUIMARÃES et al., 2019). O nível de diferenciação encontrado entre as populações, indica que a distância não confere uma barreira física efetiva ao fluxo gênico, já que o Barueiro pode ser polinizados por insetos, que normalmente alcançam distâncias relativamente pequenas e dispersadas por animais cujo alcance de dispersão é maior (TARAZI et al., 2010b).

Os resultados da análise de AMOVA confirmam a baixa diferenciação entre as cinco populações amostradas, onde a maior diversidade genética é observada dentro das populações (95% p= 0,005). É muito comum estudos realizados com espécies vegetais do Cerrado revelarem alta variabilidade genética dentro das populações, se fazendo necessário sua conservação (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006). Como o estudo realizado em *Mauritia flexuosa* (buriti), o qual que 91% da variância total foram atribuídos para a diversidade genética dentro das populações (SANDER et al., 2017). Em estudos de (MARTINS, 2011) revelou que 90% da variação está dentro das populações de *Vellozia gigantea* espécie do Cerrado. A estrutura genética das populações naturais é resultado das interações de fatores ecológicos, deriva genética, fluxo gênico, seleção natural, os quais também são responsáveis pela distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006), (VINSON et al., 2018).

As análises Bayesianas, no programa STRUCTURE apontou uma subdivisão das cinco populações estudadas em dois níveis de estruturação, sugerindo de três a quatro agrupamentos (Figura 3a e 3b), estes agrupamentos representam a estrutura do conjunto das populações estudadas. Tais agrupamentos não são bem definidos no que diz respeito às populações e, portanto, não diferenciam fortemente nenhuma das populações de acordo com suas composições genéticas. Porém ao refazer a análise de F_{ST}, agora utilizando os grupos gerados pelo programa STRUCTURE, o mesmo mostrou maior diferenciação

entre as populações BAP e BAF com valor para F_{ST} (0,133), estatisticamente significativo, esta diferenciação pode ser explicada pelo fato que, os indivíduos amostrados na população BAP eram jovens por possuírem baixos DAP.

As inferências levando em consideração os valores de F_{ST} devem ser considerados com parcimônia. Os agrupamentos, como podem ser observados na (Figura 3b e Tabela 9), aparentemente, são corroborados pelo resultado da PCoA onde o grupo I é composto na sua maioria por indivíduos das populações BAF e BASC, o grupo II por BAS e BAP, enquanto o grupo III por BAVC.

O resultado do teste de Mantel, revela que existe uma correlação positiva (r=0,310, p=0.001) entre a distância genética e a distância geográfica existente entre os agrupamentos de indivíduos das populações estudadas, por ela ser muito baixa, indica que menos de 10% da variação genética pode ser explicada pela variação da distância geográfica. A correlação positiva fraca, porém, significativa entre a distância genética e a distância geográfica indicando que no passado o fluxo era suficiente para evitar diferenciação populacional devido à deriva e também, levar em consideração o fato que a população de reflorestamento foi restaurada por sementes provenientes de várias regiões, ou seja, é formada por um conjunto de indivíduos reunidos de diferentes populações nativas., sendo assim uma justificativa para tais resultados. Este resultado pode indicar que a composição genética histórica da população estudada esteja se modificando devido ao processo de fragmentação recente (cerca de 70 anos), haja vista que BAF, BAS e BASC apresentam DAP (médio) acima de 79,07, nessas populações os indivíduos amostrados foram basicamente todos adultos. Enquanto que BAP apresenta um DAP (médio) de 37,03, esta população pertence ao Parque do Bacaba, uma área onde funcionou uma base da Força Aérea Brasileira, a qual na década de 40 serviu como suporte para a Expedição Roncador-Xingu, porém os indivíduos amostrados foram os mais jovens. Por outro lado, a população BAVC é uma área recente de recomposição florestal através da mistura de sementes nativas provenientes da Rede de Sementes do Xingu que pode explicar a composição do grupo III.

A pouca diferenciação genética encontrada entre as populações permite presumir que no passado faziam parte de uma população contínua. Dessa forma, como mais de 90% da diversidade genética distribui-se dentro das populações, a conservação *in situ* das cinco populações, podem ser estratégias escolhidas para conservar a diversidade genética total nas áreas amostradas.

5. CONCLUSÃO

Existe elevada variabilidade genética, para as populações de *D. alata* com relação aos marcadores microssatélites desenvolvidos para espécie. Os valores médios de diversidade genética, heterozigosidade observada, coeficiente de endogamia intrapopulacional e riqueza alélica demostrou uma moderada e sutil variação na diversidade genética entre as populações avaliadas, a qual, a porcentagem de maior variabilidade encontra-se distribuída dentro das populações de *D. alata*. O padrão de divergência entre as populações demonstrou-se moderadamente estruturadas sugerindo um perfil de uma grande e continua população no passado, para as populações naturais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, F. O.; SOUSA, R. S. DE. Compostos bioativos em frutos pequi (caryocar brasiliense camb.) E baru (dipteryx alata vogel) e seus usos potenciais: uma revisão / Bioactive compounds in fruits pequi (caryocar brasiliense camb.) E baru (dipteryx alata vogel) and their potential uses: a review. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 7, p. 9259–9270, 8 ago. 2019a.

BATISTA, F. O.; SOUSA, R. S. DE. Compostos bioativos em frutos pequi (caryocar brasiliense camb.) E baru (dipteryx alata vogel) e seus usos potenciais: uma revisão / Bioactive compounds in fruits pequi (caryocar brasiliense camb.) E baru (dipteryx alata vogel) and their potential uses: a review. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 7, p. 9259–9270, 8 ago. 2019b.

BONI, T. S. et al. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO ESTADO NUTRICIONAL DE MUDAS DE BARU (Dipteryx alata). **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 109–121, mar. 2016.

BOTREL, M. C. G. et al. Caracterização genética de Calophyllum brasiliense Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, v. 30, n. 5, p. 821–827, out. 2006.

CABALLERO, A. et al. Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. 2010.

CARRAZZA, L. R.; D' ÁVILA, J. C. C. **Manual tecnológico de aproveitamento integral do fruto do Baru**. [s.l.] Instituto Sociedade, População e Natureza, 2010.

CRUZ, K. S. DA et al. Partial characterization of proteins from baru (Dipteryx alata Vog) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 11, p. 2006–2012, 2011.

DIAS, N. L. S.; FERREIRA, R. L. Auditoria ambiental nas queimadas de cana-de-açúcar para reposição da fauna e flora. **Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 5, n. 3, 27 mar. 2017.

DINIZ-FILHO, J. A. F. et al. Planning for optimal conservation of geographical genetic variability within species. 2012a.

DINIZ-FILHO, J. A. F. et al. Planning for optimal conservation of geographical genetic variability within species. **Conservation Genetics**, v. 13, n. 4, p. 1085–1093, 1 ago. 2012b.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, jun. 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

FAJARDO, C. G. et al. Genetic diversity in natural populations of Hancornia speciosa Gomes: Implications for conservation of genetic resources. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 623–630, dez. 2018.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. **Genetics**, v. 164, n. 4, p. 1567–1587, 1 ago. 2003.

FURLAN, R. DE A. et al. Estrutura genética de populações de melhoramento de Pinus caribaea var. Hondurensis por meio de marcadores microssatélites. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 553–563, 2007.

GOIS, I. B. et al. Genetic Variability in Natural Populations of Cassia grandis L. F. **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 4, 2018.

GOLUNSKI, C. et al. Diversity and genetic structure in Ocotea odorifera (Vell.) Rohwer (Lauraceae) from southern Brazil. 5 maio 2019.

GUIMARÃ£ES, R. A. et al. Discovery and characterization of new microsatellite loci in Dipteryx alata Vogel (Fabaceae) using next-generation sequencing data. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 28 abr. 2017a.

GUIMARÃ£ES, R. A. et al. Discovery and characterization of new microsatellite loci in Dipteryx alata Vogel (Fabaceae) using next-generation sequencing data. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 28 abr. 2017b.

GUIMARÃES, R. A. Estrutura genética molecular de uma coleção de Germoplasma in vivo e ex situ de Dipteryx alata Vog. 28 fev. 2014.

GUIMARÃES, R. A. et al. Assessing genetic diversity and population structure in a Dipteryx alata germplasm collection utilizing microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 329–336, set. 2019.

HAMRICK, J. L. Tropical breeding systems: one and done? **Heredity**, v. 109, n. 6, p. 330–331, 1 dez. 2012.

HUFFORD, K. M.; HAMRICK, J. L. Viability Selection at Three Early Life Stages of the Tropical Tree, Platypodium Elegans (fabaceae, Papilionoideae). **Evolution**, v. 57, n. 3, p. 518–526, 2003.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 15 jun. 2012.

KLINK, C.; MACHADO, R. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, 1 jan. 2005.

MARIMON, B. S. et al. Environmental determinants for natural regeneration of gallery forest at the Cerrado/Amazonia boundaries in Brazil. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 107–118, mar. 2010.

MARIMON JUNIOR, B. H.; HARIDASAN, M. Comparação da vegetação arbórea e características edáficas de um cerradão e um cerrado sensu stricto em áreas adjacentes sobre solo distrófico no leste de Mato Grosso, Brasil. 2005.

MARQUES, E. Q. et al. Redefining the Cerrado–Amazonia transition: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 5, p. 1501–1517, 1 abr. 2020.

MARTINS, A. P. V. Desenvolvimento de marcadores microssatélites e variabilidade genética em populações de Vellozia gigantea (Velloziaceae), espécie endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó, Minas Gerais. 30 ago. 2011.

MELO, D. B. et al. Optimizing sampling efforts for ex situ conservation of genetic variability of Dipteryx alataVogel. **BMC Proceedings**, v. 5, n. 7, p. P18, 13 set. 2011.

MENDONÇA, R. et al. Flora vascular do bioma Cerrado. In: [s.l: s.n.]. p. 421–1279.

MORAES, M. C. DE et al. Genetic diversity in matrices and progenies of Euterpe edulis Mart. in managed area and in natural populations by microsatellites markers. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 2, p. 583–594, abr. 2020.

MOURA, T. M. DE et al. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de Solanum spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. jun. 2009.

NAVARRO, C. et al. Genetic resources and conservation of mahogany in Mesoamerica. In: MERY, G. et al. (Eds.). . **Forests and society - responding to global drivers of change**. Vienna: IUFRO, 2010. p. 369–383.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294–307, 2006.

OLIVEIRA, M. I. B.; SIGRIST, M. R. Fenologia reprodutiva, polinização e reprodução de Dipteryx alata Vogel (Leguminosae-Papilionoideae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 31, p. 195–207, jun. 2008.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288–295, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 1 out. 2012.

PIRANI, F. R.; SANCHEZ, M.; PEDRONI, F. Fenologia de uma comunidade arbórea em cerrado sentido restrito, Barra do Garças, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 1096–1110, dez. 2009.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 1 jun. 2000.

RAMOS, S. L. F. et al. Genetic structure in populations of Euterpe precatoria Mart. in the Brazilian Amazon. 2021.

RAPOSO, A. et al. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1291–1298, set. 2007.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253–260, 1 jan. 2006.

SANDER, N. et al. Diversidade genética e estrutura populacional de Mauritia flexuosa L. f. no Cerrado e no Pantanal. **Boletimdo Museu Paraense Emilio Goeldi:Ciencias Humanas**, v. 12, 1 ago. 2017.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. DE. Baru: biologia e uso. 2004.

SANTOS, M. Z. F. DOS; CRISTO, S. S. V. DE; MOREIRA, C. J. UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DA NATUREZA COMO ESTRATÉGIA DE CONSERVAÇÃO SOCIOAMBIENTAL. **Revista Interface (Porto Nacional)**, v. 18, n. 18, p. 64–78, 2019.

SILVA, A. V. C. et al. Research Article Genetic diversity of the mangaba GeneBank using microsatellites. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 1, 2019.

SOARES, T. N. et al. Development of microsatellite markers for the neotropical tree species Dipteryx alata (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. e72–e73, 2012.

SOUSA, F. F. DE et al. EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE MUDAS DE *Dipteryx alata* SOB LIMITAÇÃO NUTRICIONAL. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 102–114, mar. 2018.

STRASSBURG, B. B. N. et al. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1–3, 23 mar. 2017.

TARAZI, R. et al. High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian cerrado fruit tree Dipteryx alata Vog. (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 78–85, 2010a.

TARAZI, R. et al. High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian cerrado fruit tree Dipteryx alata Vog. (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 78–85, 2010b.

TELLES, M. P. DE C. et al. Genetic structure of natural populations of Tibouchina papyrus (pau-papel) in areas of cerrado rupestrian fields. **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, n. 2, p. 291–300, jun. 2010.

VIEIRA, M. L. C. et al. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312–328, set. 2016.

VINSON, C. C. et al. Isolation of polymorphic microsatellite markers for the tetraploid Dipteryx odorata, an intensely exploited Amazonian tree species. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 6, p. 1542–1544, 2009.

VINSON, C. C. et al. Using molecular markers to investigate genetic diversity, mating system and gene flow of Neotropical trees. **Revista brasileira de botânica**, 2018.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. A treatise in four volumes. Volume 4. Variability within and among natural populations. **Evolution and the genetics of populations. A treatise in four volumes. Volume 4. Variability within and among natural populations.**, 1978.

ZUCCHI, M. I. et al. Transferability of microsatellite markers from Eucalyptus spp. to Eugenia dysenterica (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 512–513, 2002.