

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Diversidade, estrutura genética e domesticação de piquiazeiros (*Caryocar villosum*) em duas localidades da Amazônia brasileira

Ana Flávia Francisconi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2019

Ana Flávia Francisconi
Bacharela em Engenharia Florestal

Diversidade, estrutura genética e domesticação de piquizeiros (*Caryocar villosum*) em duas localidades da Amazônia brasileira

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Francisconi, Ana Flávia

Diversidade, estrutura genética e domesticação de piquazeiros (*Caryocar villosum*) em duas localidades da Amazônia Brasileira/Ana Flávia Francisconi -
- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -
Piracicaba, 2019.

117 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Estrutura genética espacial 2. Diversidade genética 3. Espécie incipientemente domesticada 4. Microssátelites 5. Modelagem de nicho ecológico. I. Título

Dedicatória: Aos meus pais,
José Melchiades e Lana,
por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, Escola Superior em Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, e ao Departamento de Genética, pela oportunidade de obter o título de mestra.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, processo 2017/04868-6, que concedeu minha bolsa de mestrado.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Elizabeth, por todo apoio, compreensão e conhecimento compartilhado durante meu mestrado. Sua calma e respeito foram um grande exemplo profissional que levarei comigo em minhas próximas etapas.

Aos amigos da salinha, Gabriel, Flaviane, Iris, João, Natália, Wellington e Jucelene, por todos os bons momentos e pelas nossas discussões sobre a vida, o universo e tudo mais. Cada um contribuiu nesse trabalho com sua palavra de incentivo e seu tempo disponível em me ajudar. Agradeço também ao biólogo Igor Araújo pela ajuda com a Modelagem de Nicho Ecológico. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Gabriel Dequigiovanni, pela ajuda desde a extração do DNA até as análises e discussões.

Agradeço também ao Dr. Charles R. Clement, a MSc. Rubana Alves Palhares e a toda equipe do INPA que contribuíram para a coleta dos piquizeiros na FLONA do Tapajós – PA. Também agradeço ao Charles pela verba disponibilizada para eu participar das coletas na RESEX Rio Ouro Preto- RO e no auxílio à escrita. E à Rubana, por ter organizado nossa expedição. Agradeço aos moradores da FLONA e RESEX por nos atender, compartilhar experiências, e nos ensinar mais sobre o piquiá e outras espécies florestais de grande importância. Levarei nossas conversas e suas visões de vida como as maiores lições desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Genética por sempre estarem disponíveis em nos ajudar. Em especial, agradeço ao nosso técnico Marcos Cella, pela ajuda nas extrações do DNA e pela grande amizade. Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ-USP que contribuíram para o meu amadurecimento e pensamento crítico.

Aos amigos da academia Betty Training, em especial ao time Funcional e a nossa educadora física, Patrícia, por manter nossos corpos e mentes sãs. Agradeço também aos meus queridos amigos Henrique, Liamara e Maria pelo companheirismo, preocupação e, principalmente, por tornarem meus dias em Piracicaba mais felizes.

Agradeço aos meus pais, por me compreenderem e me apoiarem nessa trajetória, fazendo meus objetivos e sonhos se tornarem realidade. Por fim, agradeço à Deus, por me iluminar e pelo que há de bom em minha vida.

*“There will be an answer,
Let it be...”*

Lennon/ McCartney (1970)

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. OBJETIVO GERAL	13
1.1.1. <i>Objetivos específicos</i>	13
1.2. HIPÓTESES	13
1.3. REVISÃO DE LITERATURA	14
1.3.1. <i>Domesticação</i>	14
1.3.2. <i>Piquiá, seus usos e domesticação</i>	17
1.3.3. <i>Características morfológicas e distribuição do <i>Caryocar villosum</i></i>	19
1.3.4. <i>Marcadores microsatélites</i>	23
1.3.5. <i>Gênero <i>Caryocar</i> e estudos de genética de populações</i>	24
REFERÊNCIAS	27
2. DIVERSIDADE GENÉTICA E DOMESTICAÇÃO DE PIQUIAZEIROS (<i>CARYOCAR VILLOSUM</i>) EM MATA E QUINTAIS NA FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
2.1. INTRODUÇÃO	35
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.2.1. <i>Localização e caracterização da área de estudo</i>	37
2.2.2. <i>Amostragem</i>	39
2.2.3. <i>Extração de DNA e genotipagem</i>	41
2.2.4. <i>Análise estatística dos dados</i>	42
2.2.4.1. <i>Diversidade genética e índices de fixação (endogamia)</i>	42
2.2.4.2. <i>Estrutura genética espacial</i>	43
2.2.4.3. <i>Estrutura genética</i>	43
2.3. RESULTADOS	45
2.3.1. <i>Diversidade genética</i>	46
2.3.2. <i>Estrutura Genética Espacial</i>	48
2.3.3. <i>Estrutura genética</i>	48
2.4. DISCUSSÃO	57
2.4.1. <i>Diversidade genética</i>	57
2.4.2. <i>Estrutura genética espacial</i>	58
2.4.3. <i>Estrutura genética</i>	60
REFERÊNCIAS	63
ANEXO 1. LISTA DE ESPÉCIES CONSIDERADAS INCIPIENTEMENTE DOMESTICADAS POR CLEMENT (1999A) QUE POSSUEM ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA COM MARCADORES MOLECULARES (HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA - H_O, HETEROZIGOSIDADE ESPERADA- H_E).....	71
3. ESTRUTURA GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO POTENCIAL DE <i>CARYOCAR VILLOSUM</i> EM DIFERENTES LOCALIDADES DA AMAZÔNIA.....	79
RESUMO.....	79
ABSTRACT.....	80
3.1. INTRODUÇÃO	81
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
3.2.1. <i>Localização e caracterização das áreas de estudo</i>	83

3.2.2. Amostragem	84
3.2.3. Extração e genotipagem do DNA.....	86
3.2.4. Análise estatística dos dados	87
3.2.4.1. Diversidade genética e estrutura genética espacial	87
3.2.4.2. Estrutura genética populacional.....	88
3.2.4.3. Potencial distribuição do <i>Caryocar villosum</i>	89
3.3. RESULTADOS	90
3.3.1. Diversidade genética	90
3.3.2. Estrutura Genética Espacial.....	92
3.3.3. Estrutura Genética.....	93
3.3.4. Potencial de distribuição da espécie <i>Caryocar villosum</i>	99
3.4. DISCUSSÃO	103
3.4.1. Diversidade genética	103
3.4.2. Estrutura genética espacial	104
3.4.3. Estrutura genética.....	106
3.4.4. Potencial de distribuição de <i>Caryocar villosum</i>	108
REFERÊNCIAS	111
4. CONCLUSÕES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

RESUMO

Diversidade, estrutura genética e domesticação de piquiazeiros (*Caryocar villosum*) em duas localidades da Amazônia brasileira

O piquiazeiro (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.) é uma arbórea presente no bioma Amazônico, sendo seus principais usos os alimentícios e madeireiros. O piquiazeiro encontra-se incipientemente domesticado, e a seleção e manejo feitos por populações tradicionais pode estar promovendo a continuidade desse processo, que se iniciou na Amazônia por volta do final do Pleistoceno e início do Holoceno, e hoje está sendo retomado por populações tradicionais que fazem cultivos em seus quintais, entre elas o piquiazeiro. Apesar de seu uso por populações tradicionais e do potencial comercial, a diversidade e distribuição do piquiazeiro ainda foram pouco estudadas. Os objetivos desse estudo foram analisar a diversidade genética e a estrutura genética de piquiazeiros em duas situações. A primeira foi examinando o processo de domesticação do *C. villosum* por populações tradicionais na Floresta Nacional (FLONA) do Tapajós e a segunda foi comparando a população da FLONA do Tapajós, no Pará, com outra localizada na Reserva Extrativista (RESEX) Rio Ouro Preto, em Rondônia. Na FLONA foram genotipados, com o uso de sete marcadores microssátelites, 67 indivíduos da mata e 26 cultivados nos quintais. Maior riqueza alélica, número de alelos, número de alelos efetivos, alelos privados e heterozigosidade observada foram encontrados na mata, assim como estruturação genética espacial nos indivíduos de quintal, o que indica a domesticação da espécie, apesar da baixa estruturação genética encontrada entre os grupos mata/quintal nos métodos aplicados. Na segunda parte foram genotipados 130 piquiazeiros, sendo 92 do Pará, os mesmos utilizados no estudo da domesticação, somados a 38 de Rondônia. O Pará apresentou valores superiores para número médio de alelos/loco, número efetivo de alelos, número de alelos privados, riqueza alélica e heterozigosidade esperada, indicando um possível centro de origem da espécie. A estrutura genética espacial foi significativa em ambas as localidades, o que sugere correlações de parentesco entre os indivíduos, provavelmente devido ao comportamento forrageiro de seus polinizadores e dispersores. A estruturação genética entre as duas localidades foi observada em todos os métodos, sendo que a maior parte da variação (89%) ocorre dentro das populações. A diferenciação entre as populações (11%) pode ser explicada por fatores históricos e pelo elevado fluxo gênico ($Nm = 2,043$). Foi também feita uma modelagem de nicho ecológico para determinar a distribuição da espécie. Foi observada a predominância de ocorrência da espécie no bioma Amazônico, com maior adaptação a climas quentes, com médias superiores a 18°C em todos os meses, e úmido, apresentando de 1 a 3 meses de seca.

Palavras-chave: Estrutura genética espacial; Diversidade genética; Espécie incipientemente domesticada; Microssatélites; Modelagem de nicho ecológico

ABSTRACT

Diversity, genetic structure and domestication of piquiás (*Caryocar villosum*) in two localities of the Brazilian Amazon

Piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.) is a tree species present in the Amazon biome, used mainly for food and timber. Piquiá is incipiently domesticated, and the selection and management by traditional populations may be promoting the continuity of this process. This process began in the Amazon around the end of the Pleistocene and the beginning of the Holocene, and today is being resumed by traditional populations, which cultivate different species in their backyards, among them is the piquiá. Despite its constant use by traditional populations and commercial potential, the diversity and distribution of piquiá have been little studied. The objectives of this study were to analyze the genetic diversity and the genetic structure of piquiás in two different cases. The first was to examine the process of domestication of *C. villosum* by traditional populations in the Floresta Nacional (FLONA) do Tapajós. The second one was to compare the piquiás populations from the FLONA do Tapajós, in Pará, with another one located in the Reserva Extrativista (RESEX) Rio Ouro Preto, in Rondônia. Sixty-seven individuals from the forest and 26 cultivated in the backyards were genotyped, with the use of seven microsatellite markers, in FLONA. Higher allelic richness, number of alleles, number of effective alleles, private alleles and observed heterozygosity were found in the forest, as well as spatial genetic structuring in backyard individuals, which indicates the domestication of the species, despite the low genetic structure found between the forest/backyards groups in the applied methods. In the second part, 130 piquiás were genotyped, being 92 of Pará, the same ones used in the study of domestication, and 38 of Rondônia. Pará presented higher values for average number of alleles/locus, effective number of alleles, number of private alleles, allelic richness and expected heterozygosity, indicating a possible center of origin of the species. The spatial genetic structure was significant in both localities, suggesting kinship correlations among the individuals, probably due to the forage behavior of their pollinators and dispersers. Genetic structuring between the two localities was observed in all methods, with most of the variation (89%) occurring within populations, according to AMOVA. The differentiation between populations (11%) can be explained by historical factors and high gene flow ($Nm = 2,043$). According to the Ecological Niche Modeling, used to verify the species distribution, the piquiá occurs predominantly in the Amazonian biome, with best suitability in hot climates, with temperature averages above 18°C, and humid, presenting between 1 and 3 months of drought.

Keywords: Spatial genetic structure; Genetic diversity; Incipiently domesticated species; Microsatellites; Ecological niche modeling

1. INTRODUÇÃO

O piquiazeiro (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.) é uma espécie amplamente distribuída pela Floresta Amazônica (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016). Seus principais usos são o madeireiro e alimentação (consumo do fruto). Seu óleo possui potencial comercial devido a propriedades medicinais e características similares ao óleo de dendê, tornando-o interessante à indústria de cosméticos (CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 2000). As flores de piquiá tem antese noturna, cor amarela, grande quantidade de néctar, odor forte e pouco agradável e grande quantidade de pólen, dessa forma, é uma espécie com características típicas da síndrome de quipropterofilia, podendo ter dispersão de pólen em longas distâncias, o que potencialmente aumenta seu fluxo gênico (MARTINS; GRIBEL, 2007; COLLEVATTI et al., 2009b). Clement (1999a) sugere que o piquiazeiro é incipientemente domesticado, e que a seleção e manejo feito por populações tradicionais está promovendo a continuidade do processo de domesticação do piquiá.

Espécies cultivadas e selvagens podem apresentar diferentes caracteres quando são alvo da seleção humana. O contínuo de exploração, seleção, cultivo e manejo de plantas resulta no conhecido processo de domesticação em que se observa mudanças morfológicas e, mais profundamente, mudanças genéticas que distinguem a cultura domesticada do seu progenitor selvagem (MARTINS, 1994; PICKERSGILL, 2007). A domesticação de plantas é um processo a longo prazo, em que a seleção natural é somada à seleção humana para aumentar a utilidade e adaptação tanto do espaço como das plantas em favor do homem (HARLAN, 1992; CLEMENT, 1999a).

Desde tempos pré-históricos, nas terras baixas da América do Sul, plantas são selecionadas e cultivadas pela ação humana para serem utilizadas como alimentos (MARTINS, 1994). Na Amazônia, estima-se que o processo de seleção de espécies feito por populações tradicionais tenha se iniciado entre o final do Pleistoceno e início do Holoceno. O grande número de espécies domesticadas nessa área a tornou um dos principais centros de domesticação (CLEMENT, 1999a, 1999b; CLEMENT et al., 2010). Próximo ao contato europeu, em 1492, ao menos 83 espécies nativas estavam domesticadas em algum grau, como, por exemplo, mandioca, batata-doce, cacau, tabaco, maçãs, abacaxis e pimentas, bem como inúmeras árvores frutíferas e palmeiras (CLEMENT et al., 2010).

Quintais são sistemas agroflorestais com plantas domesticadas e selvagens para usos múltiplos, encontrados em diversas partes do mundo, inclusive próximos a parques arqueológicos da Amazônia. A localização de quintais na Amazônia sugere que durante a

conquista europeia e subsequente colonização do Brasil, muitos desses locais foram abandonados e hoje se encontram reocupados por populações modernas, devido aos seus solos ricos e localizações favoráveis (LINS et al., 2015). A reocupação de quintais tem levado ao restabelecimento da domesticação e seleção que ocorria antes do contato, pois populações tradicionais mantêm diversas culturas em seus quintais com o plantio e manejo de espécies selvagens (MARTINS, 1994) e entre as espécies encontradas em quintais pela Amazônia está o piquiá (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016).

Apesar da sua importância histórica, do constante uso por populações tradicionais e do potencial comercial, a diversidade e distribuição do piquizeiro ainda foram pouco estudadas. Estudar a variação genética de uma espécie combinado com dados ambientais pode esclarecer as contribuições do fluxo gênico, eventos históricos e como o ambiente influencia o padrão de distribuição da espécie (SORK, 2016). Há também a necessidade de entender como a variação genética de uma espécie está distribuída para tomar as melhores decisões para preservar sua diversidade genética (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Uma forma de prever a distribuição de uma espécie para amostrá-la é por meio de modelagem de nicho ecológico, que envolve desde observações da espécie em campo até variáveis de padrão ambiental, as quais podem afetar direta ou indiretamente o gradiente de distribuição da espécie (GUISAN; THUILLER, 2005).

Além disso, padrões de diversidade genética entre populações podem contribuir para entender um dos principais efeitos da domesticação, o afinamento genético ou *bottleneck*. Esse efeito ocorre devido a questões de amostragem, levando à redução de indivíduos que compõem uma população (HANCOCK JF, 2004). Marcadores moleculares têm sido utilizados para explicar a distribuição e estrutura genética das espécies (COLLEVATTI et al., 2009b), assim como para comparar a diversidade em populações selvagens, possivelmente domesticadas e cultivadas. Dentre os marcadores moleculares mais utilizados, estão os marcadores de DNA, como RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) e microssatélites ou SSR (Single Sequence Repeats), que foi escolhido para ser utilizado nesse estudo devido as suas propriedades como codominância, reprodutibilidade e polimorfismo (SCHLÖTTERER, 2004; VIEIRA et al., 2016), além dos marcadores de nova geração, como os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), que vêm sendo também muito utilizados atualmente. O estudo integrado desses fatores é útil para entender o processo de domesticação de uma espécie (Lins Neto et al., 2014).

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho consiste em estudar a diversidade genética e estruturas genéticas de piquiazeiros em duas situações. A primeira situação é investigando o processo de domesticação do *C. villosum* por populações tradicionais na FLONA do Tapajós, analisando os resultados dos parâmetros entre piquiazeiros encontrados em quintais e na mata. Na segunda parte será feita a comparação entre a população de piquiazeiros da FLONA do Tapajós, no Pará, com outra localizada na Reserva Extrativista Rio Ouro Preto, em Rondônia.

1.1.1. Objetivos específicos

1. Analisar a diversidade genética, com o uso de marcadores microssatélites, dos piquiazeiros de mata e de quintais, utilizando estimativas de diversidade como o número de alelos por locos, riqueza alélica, heterozigosidades esperadas e observadas, e índice de fixação.
2. Determinar se os genótipos de piquiazeiros de quintal já possuem um determinado nível de domesticação em função da seleção humana que os diferem dos piquiazeiros de mata, de tal forma que ocorra uma divisão populacional vista nas análises de agrupamento e estrutura genética.
3. Determinar a estrutura genética espacial (EGE) e o fluxo gênico em piquiazeiros de mata e quintal. A EGE irá definir se há maior similaridade entre vizinhos do que com indivíduos distantes; endogamia irá mostrar se os cruzamentos são aleatórios, e assim será determinado se está ocorrendo fluxo gênico entre piquiazeiros de mata e de quintal.
4. Determinar a diversidade genética, a estrutura genética espacial, a estrutura genética e o fluxo gênico de piquiazeiros de duas diferentes regiões da Amazônia, Pará e Rondônia, a fim de compará-las e definir se fatores naturais, como longas distâncias, e/ou a presença do homem levaram a diferenciação dos indivíduos dessas duas regiões.
5. Realizar a modelagem de nicho ecológico baseado em variáveis bioclimáticas para definir se esses parâmetros são essenciais na distribuição da espécie e quais deles mais influenciam a adequabilidade do *C. villosum* em um determinado habitat.

1.2. HIPÓTESES

1. Na Amazônia ocorre seleção de piquiás de árvores com frutos não-amargos, o que pode causar o estreitamento da base genética, visto que a coleta de sementes pode se concentrar em determinados indivíduos. Além disso, por se encontrar perto de Terras Pretas Amazônicas, regiões consideradas de antigas ocupações humanas, sua distribuição pode ter sido influenciada pelo homem.

Portanto, a reocupação de quintais e a seleção feita pelo homem moderno, podem ter levado os piquiás dessa localidade a se diferenciarem geneticamente. Dessa forma, a seleção pode ter reduzido o tamanho populacional e sua reconstrução pode contar com uma quantidade mais restrita de alelos.

2. Espera-se um grande fluxo gênico entre piquazeiros, pois a polinização de *C. villosum* é de longa distância, visto que é feita por morcegos do gênero *Phyllostomus*. Dessa forma, a diferenciação genética entre as árvores encontradas em mata e em quintais talvez não seja tão evidente, ou seja, a ação da seleção humana na redução da diversidade genética pode ser contrabalanceada pela ação do fluxo gênico entre piquiazais.
3. Com a distância superior a 1500 km entre as duas regiões com os piquazeiros amostrados, espera-se que as populações possuam uma clara estruturação genética entre elas. Entretanto, por se tratar de uma espécie polinizada por morcegos, que podem se movimentar à longas distâncias e estar presente em regiões perto de rios, em que há possibilidade das sementes se dispersarem por via fluvial, é possível que a diferenciação entre as populações tenha fatores mais significativos do que a distância geográfica.
4. Fatores abióticos como precipitação e temperatura possuem grande contribuição para determinar a distribuição de uma espécie em seus determinados biomas. Com base em dados georreferenciados nas coletas e dados presentes em herbários online, espera-se grande concentração da espécie no bioma amazônico, conforme a delimitação dada pelas variáveis bioclimáticas que mais contribuirão com a modelagem de nicho ecológico da espécie.

1.3. Revisão de literatura

1.3.1. Domesticação

A transição do ser humano de caçador-coletor para agricultor ocorreu independentemente em diferentes locais do mundo por volta de 10.000-12.000 a 3.000-4.000 anos atrás (GEPTS; PAPA, 2003; PIPERNO, 2011; MEYER; DUVAL; JENSEN, 2012). Caçadores e coletores adquiriram conhecimento sobre as plantas e animais ao seu redor e assim, deram início a agricultura o que os fez optarem por uma vida sedentária em vilas. As teorias para essa transição envolvem desde a mudança climática e o aumento populacional, que criaram a necessidade de estocar comidas (DIAMOND, 2002; GEPTS; PAPA, 2003; PIPERNO, 2011), até o desenvolvimento de práticas culturais e crenças (HARLAN, 1992).

O conhecimento sobre as plantas fez com que os homens realizassem a seleção de fenótipos, determinando quais plantas seriam promovidas, manejadas e cultivadas. Esse

processo é denominado domesticação e é descrito como co-evolucionário, pois ao mesmo tempo em que ocorrem mudanças nos fenótipos e genótipos de plantas, elas se tornam mais úteis e adaptadas para intervenção do homem (HARLAN, 1992; CLEMENT, 1999a). Esse processo é possível pois a plasticidade presente em determinadas culturas permite a adaptação a novas circunstâncias ecológicas, quando são trazidas do seu habitat natural para áreas de cultivo (PIPERNO, 2011).

O processo de domesticação resulta no surgimento de uma série de características que as distingue dos progenitores selvagens, conhecidos como síndromes de domesticação. Exemplos de síndromes são o aumento do tamanho de sementes e diminuição da dispersão, para facilitar o controle de cruzamentos, a dormência de sementes, de modo que a germinação ocorra na época de produção desejada, o crescimento compacto, a fim de diminuir a competição e o aumento da autopolinização, e a reprodução vegetativa, para manter o fenótipo similar (GEPTS; PAPA, 2003; GEPTS, 2004). A propagação seletiva dessas linhagens pode resultar no progressivo estreitamento da base genética de uma população (TANKSLEY; MCCOUCH, 1997) e, dessa forma, a redução da diversidade genética é um processo característico das plantas durante e depois da domesticação (GEPTS, 2004).

Segundo Clement (1999a), a população domesticada é aquela que se torna dependente da intervenção humana para sua manutenção, e a população silvestre é a natural que não sofreu modificação. Esses seriam os dois extremos de um gradiente de domesticação que existe no ambiente, incluindo as plantas incipientemente domesticadas, que apresentam fenótipos pouco diferentes dos encontrados na natureza; as semidomesticadas, onde a seleção humana é mais intensa, sendo que a variabilidade genética pode ter diminuído, pois alguns fenótipos já são selecionados para constituírem a próxima geração. Existem também as populações que são acidentalmente co-evoluídas, que se adaptam aos ambientes antrópicos ao acaso, sem sofrer seleção. O auge da domesticação ocorre quando a pressão de seleção gerou uma diminuição na variabilidade genética da população e houve perda crítica da adaptação ecológica, dependendo do manejo do homem e do ambiente por ele criado para se propagar. Estima-se que nos últimos mil anos 80% da variação genética de cultivos domesticados foi perdida em relação a seus parentes selvagens, como aconteceu com as culturas da soja, trigo, café, feijão e pêssego (TANKSLEY; MCCOUCH, 1997; TUXILL, 1999; LÓPEZ-GARTNER et al., 2009; BITOCCHI et al., 2013; CAO et al., 2014), entre outras. No geral, os maiores e menores centros de domesticação foram identificados baseados em informações arqueológicas e estudos genéticos. A maioria dos centros estão alocados em áreas tropicais entre as latitudes 35°N e 35°S, em áreas montanhosas, com alternância de estações secas e

chuvosas (GEPTS; PAPA, 2003; GEPTS, 2004). A Amazônia ocupa metade da América do Sul, mas por causa da falta de dados é frequentemente negligenciada quando são discutidos as origens e diversidade de culturas, enquanto a atenção é focada em estudos nos Andes. O ambiente encontrado na Amazônia é pobre para preservação arqueológica o que levou a falta de reforços para pesquisa (MARTINS, 1994; CLEMENT, 1999a).

Uma data crucial para a domesticação de culturas na Amazônia é 1492, quando Colombo chega às Américas, iniciando dois processos: (1) a troca de animais e culturas domesticadas entre América, Europa e África (“Troca Colombiana”) (GEPTS; PAPA, 2003) e (2) o declínio populacional dos Ameríndios, o que afetou a herança genética de culturas severamente (CLEMENT, 1999a; LOUGHLIN et al., 2018).

Segundo Clement (1999b), existiram dois centros de diversidade, quatro centros menores e cinco ou mais regiões de diversidade na parte baixa da América do Sul, ao leste dos Andes, sendo que todos apresentavam de moderada a alta densidade populacional, organização social e agricultura intensa, e muitas dessas regiões não são vistas hoje. Existiam, provavelmente, 138 cultivos na Amazônia antes do contato europeu, incluindo 44 famílias botânicas, cultivadas, manejadas e promovidas, o que é aproximadamente 50% do total das Américas. Dentre as 52 espécies domesticadas, 14 são árvores frutíferas, de nozes e lianas (27%); entre as 41 semi-domesticadas, 35 são árvores ou lianas (87%); e entre as 45 de domesticação incipiente, todas são frutíferas ou produzem nozes (CLEMENT, 1999a). Recentemente foi mostrado que cerca de 85 espécies arbóreas também eram de domesticação incipiente, semi- ou totalmente domesticadas antes do contato colombiano (LEVIS et al., 2017).

Atualmente, são encontrados em quintais, conhecidos por serem sistemas agroflorestais, plantas em diversos níveis do processo de domesticação, assim como plantas selvagens para usos múltiplos. São abundantes pela Amazônia, especialmente nas margens de rios. Lins et al. (2015) estudaram ocupações modernas no Rio Urubu, um tributário do Rio Amazonas a 200 km de Manaus, e encontraram 205 espécies cultivadas em 40 quintais, com uma média de 8,2 (± 66) espécies nativas da Amazônia por quintal, sendo as espécies mais comuns: cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), presente em 65% das hortas, mandioca (*Manihot esculenta*), em 45%, e pimenta amazônica (*Capsicum chinense*) em 43%. A mandioca e a pimenta são exemplos de espécies domesticadas antes do contato europeu, e o cupuaçu, provavelmente, possui domesticação mais recente. Os diferentes graus de domesticação que são encontrados hoje podem ser explicados por origens culturais,

abandono, reocupação e ao conhecimento ecológico combinado com preferências pessoais (LINS et al., 2015).

Alguns autores já sugeriram que a diversidade genética pode ser relativamente menor na situação descrita anteriormente em plantações agroflorestais de quintais, como resultados do efeito da deriva genética devido à coleta de um limitado número de material e uma grande variação na forma de propagação (WEBER et al., 2001; HOLLINGSWORTH et al., 2005; LENGKEEK; JAENICKE; DAWSON, 2005). Hollingsworth et al. (2005) fizeram um estudo comparando a diversidade genética de *Inga edulis*, na Amazônia Peruana. Utilizando marcadores microssatélites para determinar diminuições da diversidade associados com a domesticação, os autores demonstram que há diferenças entre populações naturais e cultivadas, porém, as cultivadas ainda detêm 80% da diversidade alélica presente na natureza, o que pode refletir a contribuição da dispersão de pólen e sementes entre os dois sistemas.

1.3.2. Piquiá, seus usos e domesticação

A espécie *Caryocar villosum*, conhecida popularmente como piquiazeiro ou piquiá, pertence à família Caryocaraceae, que é exclusivamente neotropical (PRANCE; DA SILVA, 1973). A planta é da ordem Theales, composta por 25 espécies agrupadas em dois gêneros: *Caryocar* e *Anthodiscus*. São poliploides com $2n=46$ cromossomos (EHRENDORFER; MORAWETZ; DAWE, 1984).

Os piquiazeiros não são vistos na região de Terra Preta Amazônica, porém todos encontram-se próximos a elas, regiões consideradas antigas ocupações humanas, o que pode sugerir a influência do homem na distribuição do padrão da espécie e domesticação (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016), visto que, quanto maior a proximidade com sítios arqueológicos, maior a abundância e riqueza de espécies domesticadas na Amazônia (LEVIS et al., 2017). Clement (1999b) sugeriu que a espécie está passando pelo processo de domesticação incipiente, ou seja, a população foi modificada pela seleção do homem, mas o fenótipo médio ainda está dentro da variação encontrada na natureza para as características que são objeto de seleção, em regiões da Amazônia, sendo necessários estudos a níveis moleculares para determinar a existência do processo de domesticação. Estudar uma espécie em estágio de domesticação incipiente oferece uma oportunidade em analisar como o ser humano interage com as plantas em estágios iniciais da agricultura (LINS NETO et al., 2014).

O principal uso comercial do piquiazeiro é o madeireiro, pois sua madeira possui coloração de esbranquiçada para amarelada, grã áspera por causa de fibras entrelaçadas e compactas, textura média, fácil para trabalhar, e resistente à decomposição (CLAY;

SAMPAIO; CLEMENT, 2000). Segundo Shanley e Medina (2005), o fruto do piquizeiro, o piquiá, apresenta usos múltiplos, podendo ser cozido com água e sal para se comer a polpa. De sua semente podem ser obtidas amêndoas para consumo, assim como óleo para a indústria cosmética. A casca do fruto é rica em tanino, podendo ser utilizada na preparação de tinta para escrever e tingimento de tecidos. A casca também pode ser usada na fabricação de sabão. O óleo serve para cozinhar, sendo muito bom para frituras. O óleo do piquiá também é listado como cosmético, sendo usado em sabão, perfume, creme e repelente de insetos. Galuppo (2004) determinou a presença de componentes orgânicos, como esteroides, triterpenoides e outros que caracterizam o óleo do piquiá como um produto fitoterápico (compostos derivados exclusivamente de plantas).

Segundo Clay e Clement (2000), todos os usos secundários do piquiá dependem da criação de uma agroindústria para beneficiar o fruto, separar os óleos do mesocarpo e da semente e o tanino do pericarpo. O óleo do piquiá não é um atrativo em larga escala pois é muito similar ao do dendê, que já passou por melhoramento genético e produz mais. E o tanino irá competir com outros já existentes. Entretanto, é preciso considerar que o piquiá, além de usos múltiplos para as indústrias, conta com a importância para as populações tradicionais, que já o manejam para uso próprio e podem se beneficiar de iniciativas como criações de cooperativas.

Pesquisas mostram os diferentes usos do piquiá em comunidades do bioma da Amazônia. Alguns exemplos de uso por populações tradicionais foram descritas no trabalho de Almeida et al. (2013), que entrevistaram moradores na comunidade de Santo Antônio, no Assentamento Mojú I e II, oeste do Pará, onde foi apontado o uso medicinal do piquiá como curador de queimaduras. Em Manacapuru, no Amazonas, o piquiá foi apontado como alimento, sua madeira utilizada na fabricação de objetos e construção de casas (COSTA; MITJA, 2010). Moraes (2011) estudou as práticas de conservação socioambiental do piquizeiro, realizadas por agricultores da Região dos Lagos Parú e Calado, Manacapuru – Amazonas. Nessa região o piquizeiro, além de ser utilizado na alimentação, gera renda com a venda dos frutos e é utilizado para recuperar áreas desmatadas para agricultura. Na Reserva Extrativista Arióca Pruanã (REAP), em Oeiras do Pará, onde há predominância de agricultura familiar e extrativismo, espécies como castanheira (*Bertholletia excelsa* H. & B.), tucumã-açu (*Astrocaryum tucuma* Martius) e o piquizeiro (*C. villosum* (Aubl.) Pres.) são plantadas em quintais e terreiros pelos moradores. Eles reportam que o piquiá é de fácil germinação e é selecionado para que seus frutos ofereçam sabor agradável. Quando a produção de piquiá apresenta excedente para o núcleo familiar, é vendido pelas famílias nas cidades (Oeiras ou

Cametá). De acordo com os moradores, os piquazeiros são comprados pelas madeiras, e tiveram suas populações severamente reduzidas em decorrência dessa ação (SILVA-JÚNIOR, 2012).

Populações tradicionais das vilas de Maguarí e Jamaraquá da FLONA do Tapajós citaram o piquiá como, primeiramente, uma fonte de alimento. O segundo uso mais citado pelas populações é o medicinal, derivado do óleo da polpa, pois é recomendado para queimaduras na pele, micoses, dores musculares, entre outros. O óleo também é listado como cosmético, sendo usado em sabão, perfume, creme e repelente de insetos. Os entrevistados da FLONA deixaram claro que frutos menos amargos são preferencialmente selecionados e consumidos. Plantações intencionais são feitas em quintais localizadas ao lado de moradias. As sementes cultivadas são de árvores em que os frutos caídos tiveram consumo por animais observado. Além do cultivo, as populações tradicionais também realizam o manejo com a retirada de plantas daninhas e videiras, uso de fertilizantes orgânicos e realização de queimadas longe de piquazeiros. Paralelamente também ocorre a plantação acidental dos piquiás, pelo descarte de sementes no solo depois da extração de óleo para evitar acidentes devido à exposição dos espinhos do endocarpo (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016).

Em 1998, a unidade de piquiá nas feiras de Belém-PA custava entre R\$0,15 a R\$0,50. Em 2004, no começo da safra, 2 frutos eram vendidos a R\$1,00. Nesse mesmo ano, nas 10 principais feiras de Belém, foram comercializados cerca de 343 mil frutos de piquiá, o que movimentou uma renda bruta de R\$ 138 mil. Em 2008, em Belém, o preço do fruto variou entre R\$ 0,50 até R\$ 1,00 nas ruas. O preço de seu óleo nesse ano custou R\$ 35,00 o litro (SHANLEY; MEDINA, 2005). No primeiro semestre de 2011, em diferentes municípios do Pará, o preço do fruto variou entre R\$0,69 e R\$ 2,00 (PINTO et al., 2011a), sendo que no segundo semestre o fruto estava custando entre R\$ 6,00 e R\$ 6,80/kg (PINTO et al., 2011b).

1.3.3. Características morfológicas e distribuição do *Caryocar villosum*

O piquazeiro pode atingir altura de 40-50 m quando ocorre como um emergente acima do dossel, sem galhos, troncos retos, com uma copa folhosa no topo (Figura 1). Quando ocorrem em área aberta, as árvores são mais baixas, com galhos abundantes e com uma copa larga. O tronco das árvores emergentes possui por volta de 2,5 mm de DAP (diâmetro a altura do peito), sendo ele de aspecto áspero e com fissuras. As raízes são grossas e longas, mas a maioria é superficial. As folhas são trifoliadas, com a folha central mais longa e as duas laterais relativamente menores (CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 2000).

As inflorescências de *C. villosum* possuem coloração amarelada de pedúnculo longo e pouco flexível, com flores acima da folhagem. As inflorescências produzem botões verde-claros que abrem de um a dois por noite. Antes da abertura e durante a antese as flores exalam odor adocicado e pouco agradável. A produção de pólen viável por flor chega a 89%. Seus dispersores de pólen durante o dia são beija-flores *Heliothryx aurita*, abelhas (Apidae), besouros (Lampiridae) e mariposas (Noctuidae) (MARTINS; GRIBEL, 2007). Após o crepúsculo, os besouros e mariposas continuam a visitar as flores, porém as atividades dispersoras e visitas de mariposas (Sphingidae), morcegos (Phyllostomidae) e pequenos mamíferos não voadores são mais intensas, como os *Caluromys lanatus* e *C. philander* (Didelphimorphia, Caluromyidae). *Caluromys* têm uma mobilidade pequena. Provavelmente a taxa de endocruzamento e cruzamento entre parentais em função dos *Caluromys* é maior do que as causadas por morcegos (MARTINS; GRIBEL, 2007).

A fruta apresenta um peso médio de 300 g, podendo conter até 4 sementes, sendo 1 a 2 sementes encontradas com maiores frequências. Sua casca tem cores marrom acinzentadas, moderadamente lisas (Figura 2A). O pericarpo é grosso e carnudo, representa 65% do peso do fruto. O mesocarpo é oleoso, com cerca de 10% do peso do fruto. O endocarpo contém espinhos curtos (Figura 2B), e possui 23% do peso do fruto. A semente é branca e oleosa, possuindo por volta de 3% do peso do fruto. O mesocarpo/endocarpo também oleoso e duro, complementa o peso do fruto, com cerca de 35%. O período de frutificação é de março-maio em Manaus e Belém (CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 2000).



Figura 1. F Piquiazeiros (*Caryocar villosum*) em diferentes estágios de desenvolvimento: A) árvore, B e C) vareta, D) plântula. É possível observar as folhas trifoliadas, com a folha central mais longa e as duas laterais menores. Fotos tiradas na RESEX Rio Ouro Preto.

O piquiazeiro ocorre ao norte, desde o escudo da Guiana até Caiene (Guiana Francesa), ao leste, até o Pará e Roraima, e à oeste, estendendo para o Rio Negro na Amazônia (Figura 3). Na região sul da Amazônia a distribuição é limitada pelo escudo

brasileiro, que começa em São Luiz (Maranhão, Brasil), ao leste entre o Pará e Amazonas, até o oeste do norte de Rondônia (PRANCE; DA SILVA, 1973).

O *Caryocar villosum* possui características similares ao pequiheiro, *Caryocar brasiliense* Gam., que ocorre naturalmente no cerrado (DE ARAUJO, 1995). O pequiheiro atinge no máximo 10 m de altura. Tem proporção endocarpo/mesocarpo semelhante ao piquizeiro e sua exploração por comunidades locais também possui finalidade alimentícia (FAO, 1986). Grande parte dos estudos de genética de populações do gênero *Caryocar* foram realizados para a espécie *C. brasiliense*, por isso parte da revisão será baseada neles.



Figura 2. A) Fruto de *Caryocar villosum* maduro encontrado no chão da RESEX Rio Ouro Preto; B) Moradora da RESEX Rio Ouro Preto mostrando o endocarpo com espinhos dos frutos de piquiá.



Figura 3. Estados com ocorrência confirmada de *Caryocar villosum* no Brasil. Em verde, os estados do norte: Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima. Em laranja, o estado do nordeste: Maranhão. Fonte: Flora do Brasil.

1.3.4. Marcadores microssatélites

Os microssatélites são constituídos de repetições simples em tandem de DNA, compostos por 1-6 pares de bases. Cada loco é analisado individualmente com *primers*, sequencias iniciadoras de replicação de DNA, e possuem expressão codominante para discriminação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, além de serem altamente multialélicos. Apresentam grande frequência e encontram-se distribuídos aleatoriamente em eucariotos. Com amplificação feita por meio da PCR (*polymerase chain reaction*) é possível observar seu extenso polimorfismo, que é altamente reproduzível (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TÓTH et al., 2000; ELLEGREN, 2004; VIEIRA et al., 2016).

Este marcador tem se mostrado uma ferramenta de valor para análises de paternidade, para a construção de mapas de genoma com grande densidade, mapeamento de genes úteis, seleção assistida com marcadores e para o estabelecimento de relações evolutivas (PARIDA et al., 2009). Se mostraram ideais para a identificação e distinção de genótipos e em estudos de genética de populações, sendo sua habilidade de diferenciar dois parentes próximos particularmente importante para a genética vegetal (ELLEGREN, 2004; MONDINI; NOORANI; PAGNOTTA, 2009).

1.3.5. Gênero *Caryocar* e estudos de genética de populações

Somente um estudo de genética de populações foi realizado com a espécie *Caryocar villosum*, utilizando amostras de *C. villosum* e *C. microcarpum* à esquerda e à direita do baixo Rio Negro (COLLEVATTI et al., 2009a). Os autores tiveram como objetivo determinar se o rio agia como barreira geográfica entre as populações dos diferentes lados, concluindo que populações dos dois lados do Rio Negro não apresentavam diferenciação e possuíam baixa estruturação populacional para as duas espécies, assim, independente da localização, os indivíduos pertenciam a somente um *pool* genético. Outra conclusão relativa a *C. villosum* é que no final do Pleistoceno a espécie provavelmente passou por isolamento populacional em algumas áreas de terra firme na parte baixa do Rio Negro, formando refúgios durante o período glacial o que levou a extinção de outros haplótipos. Esse período foi seguido por expansão populacional, que definiu a presente distribuição de haplótipos da espécie (COLLEVATTI et al., 2009b). A falta de diferenciação genética entre as árvores de lados opostos da bacia pode estar relacionada a fatores ecológicos, como a polinização e dispersão de sementes a longa distância, visto, por exemplo, que a polinização é feita principalmente por morcegos do gênero *Phyllostomus* (GRIBEL; HAY, 1993; MARTINS; GRIBEL, 2007). Os resultados comprovam que o Rio Negro não funciona como barreira geográfica para o fluxo gênico das duas espécies (COLLEVATTI et al., 2009b).

Um estudo realizado por Collevatti, Grattapaglia e Hay (2001a) com *C. brasiliense* comparou populações contínuas e fragmentadas no cerrado. Os coeficientes de endogamia foram similares entre populações fragmentadas, com distúrbios recentes e contínuos. Esse resultado mostra que o processo de perturbação do cerrado é recente, com cerca de 60 anos, e a espécie *C. brasiliense*, por ter um ciclo de vida longo, ainda não foi afetada. Entretanto, alguns locos apresentaram excesso de heterozigotos e valores negativos de F , o que sugere que os alelos não foram unidos ao acaso e indica forças seletivas agindo sobre os locos dentro dessas populações.

Buscando maior entendimento sobre o sistema de cruzamento de *C. brasiliense*, Collevatti, Grattapaglia e Hay, (2001b) encontraram evidências que apoiam a existência de cruzamentos que não são ao acaso. Foi sugerido que *C. brasiliense* forma pequenas unidades de *demes*, resultado da restrição do fluxo gênico. Diferente da hipótese levantada no estudo com *C. villosum* (COLLEVATTI et al., 2009b), nesse caso o fluxo de gene pode estar sendo restrito pela polinização feita por morcegos, pelo fato deles estarem fazendo forrageio em grupo restringindo a dispersão a um conjunto de árvores (GRIBEL; HAY, 1993). Outro fator

que pode estar diminuindo o fluxo gênico é a restrição à dispersão de sementes. Collevatti et al. (2001a) fizeram uma observação sobre o fato de terem encontrado grande número de sementes abaixo das copas de pequizeiros, sendo a fragmentação uma das principais causas, por estar diminuindo a dispersão de sementes por pequenos animais. A comparação entre genoma de cloroplasto, microssatélite de cloroplasto e microssatélite nuclear (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001b) mostrou que o movimento do pólen é significativamente maior que a dispersão de sementes, o que também dá suporte à hipótese de que a conexão entre populações ocorre principalmente por fluxo de pólen.

Em 2009, foi estudado o aborto de sementes na espécie *C. brasiliense* com a instalação de um experimento com progênies de 18 árvores. O objetivo era verificar se sementes abortadas eram de autopolinização por meio de genotipagem com o uso de marcadores microssatélites das árvores mães, dos indivíduos presentes aos redores, que são potenciais doadores de pólen, e das sementes. O teste de parentesco mostrou que todas as sementes abortadas eram autopolinizadas, com exceção de somente três, provavelmente abortadas devido a presença de endogamia bi-parental. A competição entre irmãos foi apontada como principal motivo para as sementes de cruzamento entre parentes serem perdidas (COLLEVATTI et al., 2009b).

O sistema de cruzamento e a dispersão de pólen de *C. brasiliense* foi mais profundamente estudado em 2010 por Collevatti et al. Os autores analisaram 280 sementes de 101 árvores adultas com o uso de dez marcadores microssatélites. Foi encontrado que *C. brasiliense* apresenta sistema misto de cruzamento, pois 11,4% das sementes eram resultado de autopolinizações. A taxa de cruzamento multilocos encontrada foi de $t_m = 0,891 \pm 0,025$ e a taxa de cruzamento de único loco ($t_s = 0,819 \pm 0,025$). Esses valores indicaram a presença de baixa de endogamia bi-parental ($t_m - t_s = 0,071 \pm 0,025$), sendo observada a alta probabilidade de existência de irmãos completos dentro de matrizes de progênie ($r_p = 0,135 \pm 0,032$). Foi constatado que a distância máxima de dispersão de pólen para o pequizeiro é de 500 m e a média é de 132 m, além de raros eventos de migração ($\sim 1\% N_e m = 0.35$). A dispersão de pólen também foi superior a de sementes, a qual atinge, no máximo, 86,20 m. Foi concluído que a restrição do fluxo gênico provavelmente é resultado do comportamento forrageiro dos polinizadores e dispersores, sendo que o serviço de polinização varia entre árvores matrizes. Foi sugerido que a alta densidade e a distribuição espacial de *C. brasiliense* junto ao florescimento em sincronia pode causar um alto tempo de permanência dos polinizadores dentro de uma árvore individual ou dentro de um agregado de plantas com flores (COLLEVATTI et al., 2010).

A estrutura genética espacial da *C. brasiliense* foi estudada em 2011 por Collevatti et al., com a demarcação de duas parcelas de 2500 m². A cada 3-4 anos eram realizados o inventário do local para analisar a dinâmica da espécie. Foi feita a genotipagem com dez marcadores microssatélites em todas os indivíduos presentes nas parcelas, em diferentes estágios de vida. Observou-se que a diversidade genética não mudou nos diferentes estágios de desenvolvimento da espécie. A estrutura genética espacial se mostrou significativa em até 13 m. Esse parâmetro não se diferiu entre os estágios de desenvolvimento, provavelmente por causa do ciclo de vida longo de 200 anos do pequiheiro. Porém, o parentesco para a primeira classe de distância foi maior em adultos do que para as outras fases. Foi constatado que a sobrevivência e a mortalidade são altamente afetadas pelo genótipo de cada indivíduo, sendo a probabilidade de morte menor em indivíduos com alta heterozigosidade. Indivíduos que sobreviveram a mais de 23 anos são significativamente mais heterozigotos e tal resultado pode ser influenciado pela estrutura espacial de parentesco dessa população. A presença de parentes leva ao aumento da competição, diminuindo assim a estruturação genética espacial ao longo do tempo (COLLEVATTI; HAY, 2011). Esse resultado complementa os encontrados nos estudos anteriores (COLLEVATTI et al., 2009a, 2010), em que é visto que a dispersão de sementes e pólen é restrita, o que pode aumentar a estrutura genética espacial, e que a seleção natural tende a eliminar sementes de autopolinização. Indivíduos resultantes de autopolinização e homozigotos que prevalecem provavelmente serão eliminados nos estágios mais avançados de desenvolvimento pela seleção natural (COLLEVATTI; HAY, 2011).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, LARISSA SANTOS; GAMA, JOÃO RICARDO VASCONCELLOS; OLIVEIRA, FRANCISCO DE ASSIS; FERREIRA, MARIA DO SOCORRO GONÇALVES; MENEZES, ANTÔNIO JOSÉ ELIAS AMORIN; GONÇALVES, D. C. M. Uso de Espécies da Flora na Comunidade Rural Santo Antônio. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 4, p. 435–446, 2013.
- ALVES, R. P.; LEVIS, C.; CLEMENT, C. R. Use and Management of Piquiá Suggest in situ Domestication along the Lower Tapajós River, Brazilian Amazonia1. **Economic Botany**, v. 70, n. 2, p. 198–202, 2016.
- BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; GIARDINI, A.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; BIAGETTI, E.; SANTILOCCHI, R.; SPAGNOLETTI ZEULI, P.; GIOIA, T.; LOGOZZO, G.; ATTENE, G.; NANNI, L.; PAPA, R. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytologist**, v. 197, n. 1, p. 300–313, 2013.
- CAO, K.; ZHENG, Z.; WANG, L.; LIU, X.; ZHU, G.; FANG, W.; CHENG, S.; ZENG, P.; CHEN, C.; WANG, X.; XIE, M.; ZHONG, X.; WANG, X.; ZHAO, P.; BIAN, C.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; MA, G.; CHEN, C.; LI, Y.; HAO, F.; LI, Y.; HUANG, G.; LI, Y.; LI, H.; GUO, J.; XU, X.; WANG, J. Comparative population genomics reveals the domestication history of the peach, *Prunus persica*, and human influences on perennial fruit crops. **Genome Biology**, v. 15, n. 7, p. 1–15, 2014.
- CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. de T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade Amazonica - exemplos e estratégias de utilização**. 1. ed. Manaus- AM: Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico 2000, 2000.
- CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 188–202, 1999a.
- CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. II. Crop biogeography at contact. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 203–216, 1999b.
- CLEMENT, C. R.; DE CRISTO-ARAÚJO, M.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; PEREIRA, A. A.; PICANÇO-RODRIGUES, D. **Origin and domestication of native Amazonian crops**. [s.l: s.n.]v. 2

- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349–356, 2001a.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, n. 1, p. 60–67, 2001b.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 1, p. 105–115, 2003.
- COLLEVATTI, R. G.; LEOI, L. C. T.; LEITE, S. A.; GRIBEL, R. Contrasting patterns of genetic structure in *Caryocar* (Caryocaraceae) congeners from flooded and upland Amazonian forests. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, n. 2, p. 278–290, 2009a.
- COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Seed abortion in the bat pollinated Neotropical tree species, *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). **Botany**, v. 87, n. 11, p. 1110–1115, 2009b.
- COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics and Genomes**, v. 6, n. 4, p. 555–564, 2010.
- COLLEVATTI, R. G.; HAY, J. D. Kin structure and genotype-dependent mortality: A study using the neotropical tree *Caryocar brasiliense*. **Journal of Ecology**, v. 99, n. 3, p. 757–763, 2011.
- COSTA, J. R.; MITJA, D. Uso dos recursos vegetais por agricultores familiares de Manacapuru (AM). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 49–58, 2010.
- DE ARAUJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (caryocaraceae)-an economically valuable species of the central brazilian cerrados. **Economic Botany**, v. 49, n. 1, p. 40–48, 1995.
- DIAMOND, J. Evolution, consequences, and future of plant and animal domestication. **Nature**, v. 418, n. August, p. 700–707, 2002.
- EHRENDORFER, F.; MORAWETZ, W.; DAWE, J. The neotropical angiosperm families Brunelliaceae and Caryocaraceae: First karyosystematical data and affinities. **Plant Systematics and Evolution**, v. 145, n. 3–4, p. 183–191, 1984.

- ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.
- FAO. **Food and fruit-bearing forest forest species. 3: Examples from Latin America.** FAO Forestry Paper 44/3, Department of Forestry. Rome, Italy, 1986
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 3rd ed., EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, p. 220, 1998.
- GALUPPO, S. C. Documentação do uso e valorização do óleo de piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl) Pers.) e do leite do amapá-doce (*Brosimum parinarioides* Ducke) para a comunidade de Piquiatuba, Floresta Nacional do Tapajós. Estudos físicos, químicos, fitoquímicos e farmacológicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, 2004, p. 92.
- GEPTS, P. Selection experiment. **Plant Breeding**, v. 24, n. 2, p. 1–44, 2004.
- GEPTS, P.; PAPA, R. Evolution during domestication. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–7, 2003.
- GRIBEL, R.; HAY, J. D. of Tropical Ecology : Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. **Journal of Tropical Ecology**, v. 9, n. 2, p. 199–211, 1993.
- GUISAN, A.; THUILLER, W. Predicting species distribution: Offering more than simple habitat models. **Ecology Letters**, v. 8, n. 9, p. 993–1009, 2005.
- HANCOCK JF. **Plant evolution and the origin of crop species.** CABI, Cambridge, MA, ed. 2, 2004).
- HARLAN, J. R. **Crops and man.** Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, 1992.
- HOLLINGSWORTH, P. M.; DAWSON, I. K.; GOODALL-COPESTAKE, W. P.; RICHARDSON, J. E.; WEBER, J. C.; MONTES, C. S.; PENNINGTON, R. T. Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 497–501, 2005.
- LENGKEEK, A. G.; JAENICKE, H.; DAWSON, I. K. Genetic bottlenecks in agroforestry systems: Results of tree nursery surveys in East Africa. **Agroforestry Systems**, v. 63, n. 2, p. 149–155, 2005.

- LEVIS, C.; COSTA, F. R. C.; BONGERS, F.; PEÑA-CLAROS, M.; CLEMENT, C. R.; JUNQUEIRA, A. B.; NEVES, E. G.; TAMANAHA, E. K.; FIGUEIREDO, F. O. G.; SALOMÃO, R. P.; CASTILHO, C. V.; MAGNUSSON, W. E.; PHILLIPS, O. L.; GUEVARA, J. E.; SABATIER, D.; MOLINO, J.-F.; CARDENAS LOPEZ, D.; TER STEEGE, H. Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition. **Science**, v. 931, n. March, p. 925–931, 2017.
- LINS, J.; LIMA, H. P.; BACCARO, F. B.; KINUPP, V. F. Pre-Columbian Floristic Legacies in Modern Homegardens of Central Amazonia. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. 1–10, 2015.
- LINS NETO, E. M. D. F.; PERONI, N.; CASAS, A.; PARRA, F.; AGUIRRE, X.; GUILLÉN, S.; ALBUQUERQUE, U. P. Brazilian and Mexican experiences in the study of incipient domestication. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2014.
- LÓPEZ-GARTNER, G.; CORTINA, H.; MCCOUCH, S. R.; MONCADA, M. D. P. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, n. 3, p. 435–446, 2009.
- LOUGHLIN, N. J. D.; GOSLING, W. D.; MOTHESE, P.; MONTOYA, E. Ecological consequences of post-Columbian indigenous depopulation in the Andean–Amazonian corridor. **Nature Ecology and Evolution**, v. 2, n. 8, p. 1233–1236, 2018.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ecology & Genetic Structure**, p. 65–95, 1984.
- MARTINS, P. S. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plant species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências (Brazil)**, v. 66, p. 219–224, 1994.
- MARTINS, R. L.; GRIBEL, R. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 37–45, 2007.
- MEYER, R. S.; DUVAL, A. E.; JENSEN, H. R. Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. **New Phytologist**, v. 196, n. 1, p. 29–48, 2012.
- MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity**, v. 1, n. 1, p. 19–35, 2009.
- MORAES, R. P. **Conservação socio-ambiental do piquiá na região dos lagos Parú e Calado, no município de Manacapuru, AM.** Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - Universidade Federal do Amazonas, p. 97, Manaus, 2011

- PARIDA, S. K.; KALIA, S. K.; KAUL, S.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; PANDIT, A.; SINGH, A.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T. R.; SRIVASTAVA, P. S.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 2, p. 327–338, 2009.
- PICKERSGILL, B. Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 925–940, 2007.
- PINTO, A.; SAMPAIO, L.; AMARAL, P.; GUIMARÃES, J.; PAIXÃO, I. Índice de Preço de Produtos da Floresta. **Imazon**, v. 1, p. 12, 2011. Disponível em: <<http://imazon.org.br/PDFimazon/Portugues/preco%20de%20produtos%20da%20floresta/Indice%20PFNM%2001.pdf>>
- PINTO, A.; AMARAL, P.; GUIMARÃES, J.; SOUSA, S.; SAMPAIO, L. Índice de Preço de Produtos da Floresta. **Imazon**, v. 2, p. 12, 2011. Disponível em: <[http://imazon.org.br/PDFimazon/Portugues/preco de produtos da floresta/Boletim_IndicePreco_18ago2012.pdf](http://imazon.org.br/PDFimazon/Portugues/preco%20de%20produtos%20da%20floresta/Boletim_IndicePreco_18ago2012.pdf)>.
- PIPERNO, D. R. The origins of plant cultivation and domestication in the New World tropics. **Current Anthropology**, v. 52, n. S4, p. S453–S470, 2011.
- PRANCE, G. T.; DA SILVA, M. F. A Monograph of Caryocaraceae. **Flora Neotropica**, v. 12, p. 1–75, 1973.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 1, p. 63–69, 2004.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. 1. ed. Belém-PA: Cifor, Imazon, 2005.
- SILVA-JÚNIOR, A. L. da. Quando os paus de fruta da mata viram plantas: O amálgama entre agricultura e floresta na Resex Arióca Pruanã, Oeiras do Pará. **Novos Cadernos NAEA**, v. 16, n. 1, p. 153, 2012.
- SORK, V. L. Gene flow and natural selection shape spatial patterns of genes in tree populations: Implications for evolutionary processes and applications. **Evolutionary Applications**, v. 9, n. 1, p. 291–310, 2016.
- TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1063–1066, 1997.
- TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J.; TOTH, G.; TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research**, v. 10, n. 7, p. 967–981, 2000.

- TUXILL, J. Nature's Cornucopia: Our stake in plant diversity. **Worldwatch Paper**, p.148, Washington DC: Worldwatch Institute, 1999.
- VIEIRA, M. L. C.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. de F. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016.
- WEBER, J. C.; MONTES, C. S.; VIDAURRE, H.; DAWSON, I. K.; SIMONS, A. J. Participatory domestication of agroforestry trees: An example from the Peruvian Amazon. **Development in Practice**, v. 11, n. 4, p. 425–433, 2001.

2. DIVERSIDADE GENÉTICA E DOMESTICAÇÃO DE PIQUIAZEIROS (*CARYOCAR VILLOSUM*) EM MATA E QUINTAIS NA FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS

Resumo

A domesticação ocorre quando a seleção humana sobre fenótipos desejados resulta em mudanças nos genótipos de populações descendentes. Entender os efeitos da domesticação na diversidade genética de uma espécie é crucial para a conservação e programas de melhoramento genético. Nos quintais da Amazônia, locais que mantêm grande diversidade de plantas, populações tradicionais, como as da Floresta Nacional do Tapajós (Pará), realizam a seleção, manejo e plantio do piquiá (*Caryocar villosum*) visando o uso do seu fruto. Esta espécie foi apontada como incipientemente domesticada na era pré-Colombiana e faz parte da alimentação e medicina dessas populações. Afim de acessar a diversidade, estrutura genética e detectar os possíveis efeitos da domesticação, foram utilizados sete locos microssatélites para genotipar 67 indivíduos presentes na mata e 26 cultivados nos quintais. Maior riqueza alélica, número de alelos, número de alelos efetivos, alelos privados e heterozigosidade observada foram encontrados na mata. Os indivíduos que pertencem à mata não apresentam estrutura genética espacial significativa, diferente dos presentes em quintal, que apresentaram estruturação genética espacial até, aproximadamente, 4 metros. Isso acontece, possivelmente, pela interferência humana nos quintais e restrições ao fluxo gênico. Apesar dessas diferenças, observa-se baixa estruturação genética entre os grupos mata/quintal com os métodos aplicados. Comparando a diversidade genética do piquiá com a de outras espécies historicamente consideradas incipientemente domesticadas, é visto que os resultados de heterozigosidade observada (H_o) são similares. As sutis diferenças na diversidade genética e a baixa estruturação entre piquiazeiros cultivados nos quintais e os presentes na mata indicam um processo de domesticação da espécie pelas populações tradicionais.

Palavras-chave: Estrutura genética espacial; Estrutura genética; Espécie incipientemente domesticada; Microssatélites; Piquiá

Abstract

Domestication occurs when human selection on desired phenotypes results in genotypic changes in descendent populations. Understanding the effects of domestication on the genetic diversity of a species is crucial for conservation and breeding programs. In backyards of Amazonia, places that maintain a great diversity of plants, traditional populations, such as those of the Floresta Nacional do Tapajós (Pará), select, manage and plant piquiá (*Caryocar villosum*) for its fruit. This species was considered incipiently domesticated in the pre-Colombian era and is part of the diet and medicine of these populations. In order to access its genetic diversity, genetic structure, spatial genetic structure and to detect possible domestication effects, seven microsatellite loci were used to evaluate 67 individuals from the forest and 26 individuals cultivated in backyards. Higher allelic richness, number of alleles, number of effective alleles, private alleles and observed heterozygosity were found in the forest population. The forest individuals do not present significant spatial genetic structure, different from those in the backyards that showed spatial genetic structure up to, approximately, 4 meters. This is due, possibly, to human interference in backyards and restrictions on gene flow. Despite these differences, little genetic structure was found between forest and backyards with the methods used. Comparing the genetic diversity of piquiá with other species historically considered incipiently domesticated, the results from the observed heterozygosity are similar. The subtle differences in genetic diversity and the low structuring between piquiás cultivated in backyards and those present in the forest indicate a process of domestication promoted by traditional human populations.

Keywords: Spatial genetic structure; Genetic structure; Incipiently domesticated species; Microsatellites; Piquiá

2.1. Introdução

A domesticação de plantas é um processo co-evolucionário onde a seleção humana sobre fenótipos que serão promovidos, manejados ou cultivados resulta em mudanças nos genótipos de forma a torná-los mais úteis aos humanos e a suas intervenções na paisagem (CLEMENT, 1999a). É um processo que pode tornar as culturas completamente dependentes da intervenção humana. Entender os efeitos da domesticação na diversidade genética de uma espécie é crucial para implantar estratégias de conservação e uso apropriado da variabilidade genética em programas de melhoramento (BITOCCHI et al., 2013).

A seleção feita por humanos pode reduzir o tamanho efetivo populacional, favorecendo determinados genótipos. A recomposição da população é feita a partir de poucos indivíduos com uma quantidade restrita de alelos, dando origem ao efeito fundador, um tipo de deriva genética (HANCOCK JF, 2004; OLSEN; WENDEL, 2013). Durante a domesticação de espécies arbóreas, inicialmente os “melhores” indivíduos são manejados *in situ* para depois serem selecionados e propagados em quintais ou outras áreas de manejo antropogênico (LEVIS et al., 2017).

Quintais são importantes locais que mantêm grande diversidade de plantas, os quais servem como reserva de germoplasma para conservação de espécies (COOMES; BAN, 2004). Entre as espécies encontradas nos quintais da Amazônia está o *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers., Caryocaraceae, popularmente conhecido como piquiá (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016). O estudo feito por Alves et al. (2016), ao qual esse projeto está associado, mostrou que populações tradicionais da Floresta Nacional (FLONA) do Tapajós, no estado do Pará, realizam a seleção e plantio do piquiá em quintais, bem como manejo na floresta. Na FLONA, a principal atividade exercida por seus moradores é a agricultura, que visa o sustento familiar e venda do que é produzido em excedente. O sistema de produção é diversificado, incluindo culturas anuais, cultivos perenes, produção extrativista, pesca, caça, entre outros. Isso ocorre devido à diversidade de recursos que o ambiente florestal e ribeirinho oferece, além do conhecimento sobre manejo que as populações possuem (IBAMA, 2004).

O piquiá é apontado como parte da alimentação e medicina dessas populações, pois seu óleo possui propriedades que visam a cura de queimaduras e dores musculares (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016). Observando quais frutos os animais consomem, os moradores selecionam sementes dos frutos considerados menos amargos para serem plantados e consumidos como alimento (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016). A espécie pertence à família Caryocaraceae (PRANCE; DA SILVA, 1973). Pode atingir alturas de 40-50 m quando

ocorre como emergente acima do dossel, com troncos retos e uma copa folhosa no topo. Quando ocorre em área aberta, as árvores são mais baixas, com galhos abundantes e com copa larga. As folhas são trifoliadas, com a central mais longa e as duas laterais relativamente menores (CLAY; CLEMENT, 1993). As inflorescências de *C. villosum* possuem coloração amarelada, pedúnculo longo e pouco flexível, com flores acima da folhagem, que abrem durante a noite, com odor pouco agradável. Seus dispersores de pólen são morcegos da família Glossophaginae e *Phyllostamus discolor*. Durante o dia beija-flores (*Heliothryx aurita*), abelhas (Apidae), besouros (Lampiridae) e mariposas (Noctuidae) também realizam polinizações, em menores intensidades. Pequenos mamíferos não voadores, como os *Caluromys lanatus* e *C. philander* (Didelphimorphia, Caluromyidae), realizam a dispersão de sementes (MARTINS; GRIBEL, 2007).

Afim de acessar a diversidade, estrutura genética e espacial dos piquiazeiros existentes nos quintais e matas da FLONA de Tapajós foram utilizados marcadores microsatélites, que são amplamente utilizados para genotipar plantas, por serem altamente informativos, codominantes e multialélicos (VIEIRA et al., 2016). Esses marcadores já foram utilizados em diversos estudos envolvendo o pequi (*Caryocar brasiliense*), espécie próxima à *C. villosum*, tais como o efeito da fragmentação do cerrado na diversidade da espécie (COLLEVATTI et al., 2001a), a restrição ao fluxo gênico em função da polinização feita por morcegos (*Phyllostamus*) e a dispersão de sementes por *Caluromys* spp., com comportamentos forrageiros (COLLEVATTI et al., 2001a), análises filogeográficas (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2003), sistema reprodutivo e distâncias máximas e médias de polinização (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2009a, 2010a,b), e coeficientes de parentesco (COLLEVATTI; HAY, 2011). Somente um estudo sobre diversidade genética do piquiazeiro (*C. villosum*) foi realizado até o momento, em que foram utilizados acessos das duas margens do Rio Negro, com o intuito de definir se o rio representava uma barreira geográfica para diferenciação na espécie (COLLEVATTI et al., 2009b). Os autores concluíram que isso não ocorria, visto a baixa estruturação encontrada entre os diferentes lados do rio.

Utilizando marcadores microsatélites, os objetivos desse trabalho foram: (1) analisar a diversidade genética dos piquiazeiros de mata e de quintais da FLONA do Tapajós; (2) determinar a estrutura genética espacial (EGE), estrutura genética e o fluxo gênico entre piquiazeiros de mata e quintal; (3) determinar se os genótipos de piquiazeiros de quintal já possuem um determinado nível de domesticação em função da seleção humana que os diferem dos piquiazeiros de mata.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Localização e caracterização da área de estudo

O estudo foi conduzido em duas comunidades ribeirinhas da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA do Tapajós), no Pará, em parceria com os pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Dr. Charles Roland Clement, a MSc. Rubana Palhares Alves e a MSc. Raquel Sousa Chaves, sendo que as duas últimas realizaram a coleta de material genético dos indivíduos. O clima é tropical úmido com variação térmica anual inferior a 5 °C no sistema de Köppen, com média anual de 25,5 °C, máxima de 30,6 °C e mínima de 21,0 °C (IBAMA, 2004), com precipitações concentradas entre os meses de janeiro a maio (RADAMBRASIL, 1976). Na região da FLONA predominam os Latossolos Amarelo Distróficos, solos profundos e com baixa capacidade de troca catiônica (ESPÍRITO-SANTO, 2003).

A vegetação característica da FLONA do Tapajós é predominantemente Floresta Ombrófila Densa (VELOSO et al., 1991), com cerca de 86 % da área total, com dossel uniforme e, ocasionalmente, árvores emergentes, como é o caso do *C. villosum* (IBAMA, 2004). No plano de manejo da Floresta Nacional de Tapajós feito pelo IBAMA (2004), o mapa de vegetação adotado foi a tipologia proposta por Veloso, Rangel Filho e Lima (1991), segundo a qual a Floresta Nacional do Tapajós está localizada na zona de Floresta Ombrófila Densa, vegetação dominante no norte do país e abrange a maior parte dos estados do Pará, Amazonas, Amapá e Roraima. Foi também adotada a atualização feita por Hernandez Filho, Chung e Lee (1991) (IBAMA, 2004) (Figura 4). Hernandez Filho, Chung e Lee (1991) fizeram a primeira tentativa de testar no Brasil o sistema de inventários em múltiplos estágios. A primeira etapa contou com a estratificação da área da FLONA em classes florestais, com base em observações do sensor TM/Landsat. De acordo com os aspectos fisionômicos, somados às categorias utilizadas pelo Projeto Radambrasil, foi gerado um mapa indicando a presença de três tipos de vegetação: Floresta Tropical Densa, Floresta Tropical Aberta e Floresta Alterada. Pode-se observar na Figura 4, que para cada tipo de vegetação ocorre uma descrição específica de acordo com o relevo e a fisionomia do dossel. Outros mapas já foram feitos para a região, entretanto, nesse estudo será adotado o mesmo que é apresentado no Plano de Manejo da FLONA de Tapajós (IBAMA, 2004).

Foram feitos pelo menos cinco levantamentos florísticos na FLONA até o momento (IBAMA, 2004). Esses cinco estudos identificaram 412 espécies, pertencentes a 67 famílias. Para a família Caryocaraceae, foi determinada a presença de *C. villosum* e *C. glabrum*, esta

última conhecida como piquiarana. O levantamento que analisou todas as árvores com DAP > 3 cm em 16 parcelas de 500 m² mostrou que a família Caryocaraceae tem densidade absoluta e relativa de 6 ind/ha e 0,32 %, respectivamente. O estudo feito por Espírito-Santo (2003) em 35 parcelas de 0,25 ha determinou que a espécie *C. villosum* (piquiá) apresenta densidade absoluta e relativa ao total de 0,5 ind/ha e 0,1 %.

Segundo Clement (1999b), a região onde hoje se encontra a FLONA do Tapajós está inserida no centro de diversidade de culturas da Amazônia Central e apresenta cultivos anuais e perenes claramente associadas com a área, mas que em geral encontram-se severamente erodidas. As duas comunidades que colaboraram com o estudo, Maguarí e Jamaraquá, são ribeirinhas e se encontram na parte baixa do Rio Tapajós. O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INPA aprovou este estudo (Processo n ° 10926212.6.1001.0006). Em janeiro e fevereiro de 2015, foram entrevistados 33 informantes-chave que conhecem e usam a floresta. Os informantes moram em uma faixa de solos arenosos, menos férteis e de menor declive, fazendo limite com terrenos argilosos do planalto. As casas estão situadas em vilarejos próximos às fontes de água ou a beira de estradas e, conforme o mapa do plano de manejo (Figura 4), as duas comunidades estão em áreas de floresta alterada. No local onde o estudo foi realizado, encontram-se 97 famílias, cujas atividades de sustento incluem agricultura, turismo, artesanato e extração de madeira supervisionada pela Mixed Cooperativa da FLONA. (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016).

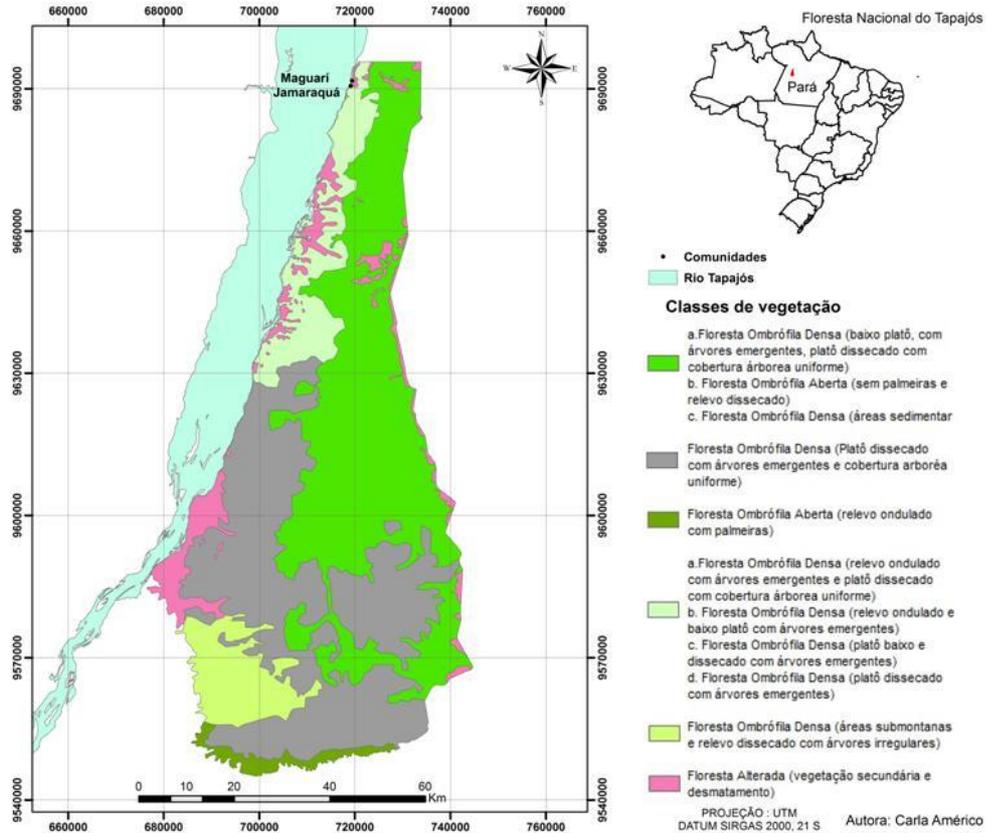


Figura 4. Mapa de vegetação da FLONA do Tapajós utilizada no Plano de Manejo (IBAMA, 2004). As comunidades Maguari e Jamaraquá, onde as coletas dos piquizeiros foram feitas, se encontram no norte da Flona em Floresta Ombrófila Densa.

2.2.2. Amostragem

A etapa inicial da amostragem ocorreu entre janeiro e fevereiro de 2015. Nesse período foi realizado o contato com as comunidades de Maguari e Jamaraquá na FLONA de Tapajós, para a caracterização da área quanto ao tipo de solo, usos da área, presença de vestígios de atividades de caça, presença de manejo e a distribuição da espécie. Também foram percorridos 80 km de trilhas na FLONA em turnês guiadas pelos informantes, para classificar a distribuição dos piquizeiros encontrados na mata (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016).

Em novembro de 2015, e também em abril e maio de 2016, com auxílio de três colaboradores, foi feito um censo das árvores plantadas nos quintais e situadas nas áreas de uso mais frequente dos comunitários. As árvores foram georreferenciadas, tiveram seus DAP medidos e foram coletadas folhas com auxílio de estilingue. Também foram relatadas as percepções dos colaboradores em relação à origem da árvore (plantada ou “da natureza”),

ocorrência agregada ou espalhada, como classificado anteriormente, e quando os colaboradores já haviam consumido o fruto, suas características foram anotadas (tamanho, cor, sabor, preferência). Dessa forma, as árvores ficaram classificadas como pertencentes a dois tipos de ambientes: quintal (áreas próximas das casas, abrangendo também sítios, roças, capoeiras e caminhos para essas áreas) e mata (floresta madura e capoeira antiga).

Todos os piquiazeiros tiveram suas folhas coletadas, armazenadas em silca gel e acondicionadas em freezer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para o atual estudo foram separados os 25 piquiazeiros encontrados em quintais e 67, de mata, totalizando 92 indivíduos. Com as coordenadas obtidas em campo, foi feito um mapa com todos os piquiazeiros encontrados a fim de obter a melhor representatividade da área (Figura 5). Em locais de maiores densidade de piquiazeiros, foi determinada uma distância mínima de 150 m entre os indivíduos para genotipagem. Outro critério para seleção de piquiazeiros aglomerados foi escolher todos os que estão sendo manejados pelas populações locais.

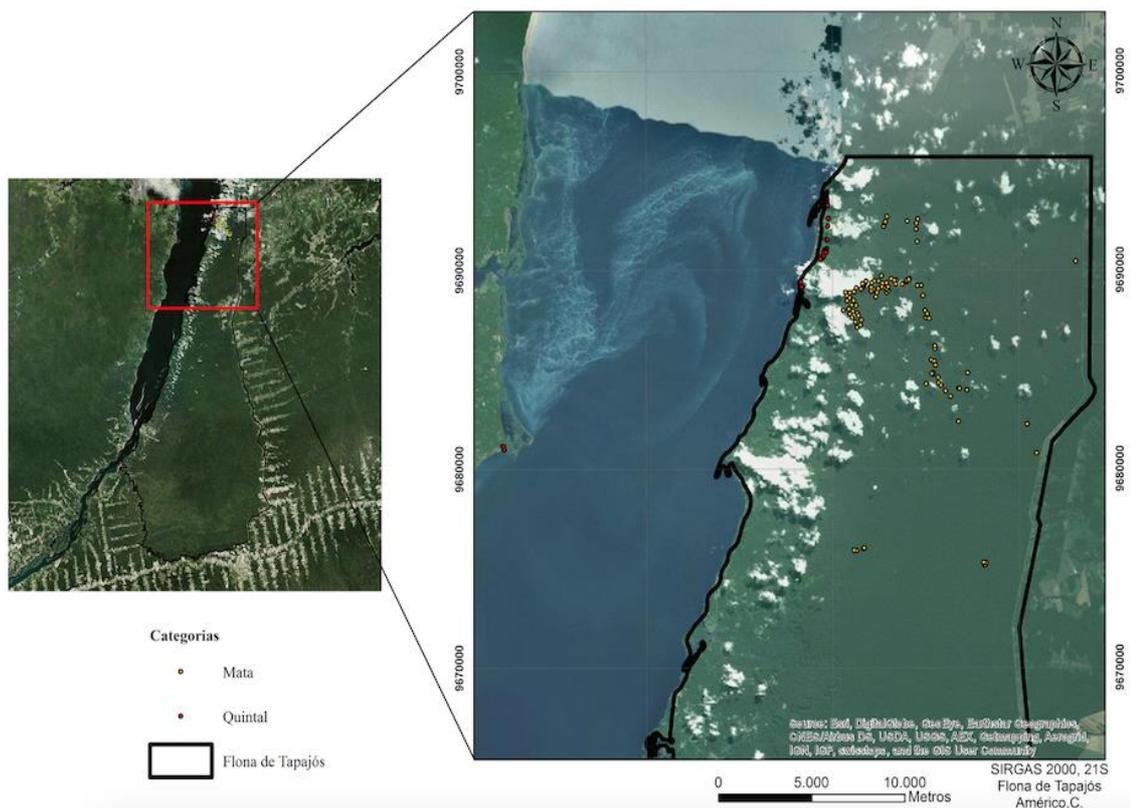


Figura 5. Distribuição dos piquiazeiros de mata (em amarelo) e de quintal (em vermelho) na FLONA do Tapajós que foram genotipados no presente estudo.

2.2.3. Extração de DNA e genotipagem

A extração de DNA genômico dos indivíduos foi realizada no Laboratório de Genética Ecológica de Plantas do Departamento de Genética, na ESALQ/USP, Piracicaba-SP. O DNA foi extraído das folhas por meio do procedimento de CTAB 2 % (Brometo de Cetiltrimetilamônio) com adaptações (DOYLE; DOYLE, 1987). Após a maceração com nitrogênio líquido, foram adicionados 900 µl de CTAB 2 %, previamente aquecidos a 65 °C, e 2 µl de 2-mercaptoetanol. As amostras foram então colocadas por três horas no banho-maria também a 65 °C. Após esse período, foram realizadas duas lavagens com 500 µl álcool isoamílico (24:1) e 50 µl de CTAB 2 %. Depois da adição do álcool isoamílico, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos em 12000 rpm, sendo a fase aquosa superior transferida para outro tubo. Foi então adicionado o CTAB 2 % e, novamente, o álcool isoamílico. Novamente a fase superior aquosa foi transferida para outro tubo. No novo tubo, foram adicionados 360 µl de isopropanol nas amostras, que depois foram agitadas e colocadas no freezer a -20 °C para a pernoite de até 12 horas. No dia seguinte, o material foi centrifugado por 10' minutos a 12000 rpm e depois lavado duas vezes com álcool 70 % e uma vez com álcool 100 %. O DNA passou por um período de secagem e depois foi ressuscitado com tampão com 30 µl TE e 3 µl de RNase. A quantificação das amostras foi estimada pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante *Gel Red* sob UV em géis de agarose a 0,8 %. Essa intensidade foi comparada à de padrões com pesos moleculares e concentrações específicas e conhecidas de DNA do fago λ (5, 20, 40, 80 e 160 ng). A eletroforese foi realizada em cuba contendo tampão TBE 1 % a uma voltagem de 2 V/cm.

Dos dez loci de microssatélites previamente desenvolvidos para *C. brasiliense* (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATAPAGLIA, 1999), sete apresentaram amplificação ideal para o material coletado de *C. villosum* e foram utilizados para genotipar as amostras. Os *primers* no sentido *forward* foram marcados com coloração fluorescente anexados ao final 5' da sequência do *primer* universal M13 (5'-CACGACGTTGTAACGAC-3').

As amplificações foram feitas utilizando o termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, US), e usaram 0,5 mM de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Phonutria), 200 mM de cada dNTP, 1X tampão (10 mM Tris-HCL pH 8,3 com 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) (COLLEVATTI et al., 2009), e 2,4 mM de MgCl₂. A PCR foi feita de acordo com Schuelke (2000) em um processo de dois passos: o primeiro passo consiste na desnaturação inicial de 96 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C ou 54 °C por 1 min (de acordo com cada *primer*- temperatura de anelamento) e 72 °C por 1 min. A

segunda parte consiste de oito ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 45 s e 72 °C por 45 s, com uma extensão final de 72 °C por 1 hora. A qualidade e o tamanho dos produtos da amplificação foram visualizados e comparados com marcador - *Ladder* 1 kb Plus (Invitrogen) - em gel de agarose a 1,5 % submetidos a eletroforese por 40 minutos a 80 V/cm.

As amplificações por PCR foram realizadas para cada um dos sete locos microssatélites, seguindo o protocolo citado no parágrafo anterior. Entretanto, para a realização da genotipagem foi utilizado o sistema multiplex. Nesse sistema, locos com diferentes tamanhos em pares de base e marcados com diferentes colorações de fluorescência são analisados conjuntamente na eletroforese, para detecção da fluorescência em que estão marcados. Dessa forma, conforme a marcação e tamanho do loco, as amostras das placas com as amplificações da PCR são adicionados à outra placa, para serem genotipadas conjuntamente. A genotipagem foi feita utilizando eletroforese capilar em analisador automático de DNA ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) feito pelo Setor de Sequenciamento de DNA do Instituto de Biociências – USP, sendo determinados os tamanhos dos alelos com o auxílio de marcador com tamanhos de fragmentos conhecidos, *GeneScan™-500 ROX® Size Standard* (Applied Biosystems, Foster City, USA) . A detecção dos picos de fluorescência foi realizada com o software GeneMapper 4.1 (*Applied Biosystems*).

2.2.4. Análise estatística dos dados

2.2.4.1. Diversidade genética e índices de fixação (endogamia)

Foram estimados parâmetros de diversidade genética e endogamia para comparação entre piquizeiros de quintal e mata. A riqueza alélica (A_R) (EL MOUSADIK; PETIT, 1996) foi calculada utilizando o pacote PopGenReport (ADAMACK; GRUBER, 2014) e o número de alelos por locos (A), número de alelos efetivos (N_e), número de alelos privados, as heterozigosidades observadas (H_O) e esperadas (H_E), a aderência as proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) sob o teste exato de Fisher, e o índice de fixação (f) de Wright sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram calculados utilizando o pacote *diveRsity* (KEENAN et al., 2013) para o plataforma R 3.4.3 (R Development Core Team, 2017), com veracidade dos parâmetros confirmada pelo método *bootstrap*, utilizando 10.000 reamostragens em nível de significância de 5 %.

Alelos nulos são uma ocorrência comum em genotipagens feitas com microsatélites e podem causar viés na estimação de alelos e frequências alélicas, aumentando, por exemplo, o número de genótipos homozigóticos e podendo causar desvios no EHW (VAN OOSTERHOUT; WEETMAN; HUTCHINSON, 2006). A verificação da presença de alelos nulos e de sua interferência nas estimativas obtidas foi realizada utilizando o *software* micro-checker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) utilizando uma repetição de 1000 vezes e intervalo de confiança de 95 %. Foi calculado o F_{ST} das estatísticas F de Wright pelo *GenAlex* v. 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012), para determinar a diferença entre os dois sistemas.

2.2.4.2. Estrutura genética espacial

O software SPAGeDi v. 1.3 (HARDY; OLIVER J; VEKEMANS, 2002) foi utilizado para determinar a estrutura genética espacial entre os genótipos de mata e entre os de quintal. O coeficiente de parentesco (F_{ij}), também conhecido como coancestria, entre pares de indivíduos foi estimado como o apresentado em Loiselle et al. (1995). Para visualizar a estrutura genética espacial, os valores de F_{ij} foram plotados contra classes de distâncias com o mesmo número de pares de indivíduos. Foi calculado um intervalo de confiança de 95 % utilizando 20.000 permutações de Monte Carlo para cada par de coeficientes de parentesco e em cada classe de distância encontrada, que foi calculada de acordo com a área estudada, de forma a garantir que a estrutura genética espacial tenha desvio significativo em relação a estrutura aleatória. A extensão da estrutura genética espacial de cada população foi quantificada calculando a estatística ' Sp ', primariamente dependente da taxa de decaimento do coeficiente de coancestria entre os pares de indivíduos com o logaritmo de distância em duas dimensões. A estatística Sp é calculada utilizando a fórmula $Sp = b \cdot \log(1 - F_1)$, em que o $b \cdot \log$ é o declínio da regressão linear entre o coeficiente de parentesco e o logaritmo de distância espacial entre os pares de indivíduos, e F_1 é o coeficiente de parentesco entre todos os indivíduos da primeira classe de distância, que incluem todos os pares de vizinhos. É esperado que a estatística Sp seja inversamente proporcional à densidade sob isolamento por distância (VEKEMANS; HARDY, 2004).

2.2.4.3. Estrutura genética

A estrutura genética existente entre a mata e os quintais foi determinada por meio de Análises Bayesianas com o programa Structure v.2.3.4. (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Foram utilizadas 10 simulações em que K variou de 1 a 10, considerando o modelo de frequências alélicas correlacionadas e o admixture de ancestralidade. A cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) teve 500.000 iterações após um período inicial de burnin de 200.000 iterações. O aplicativo on-line Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012) foi utilizado para determinar o K mais provável de agrupamentos, baseado no ΔK do método de Evanno, Regnaut e Goudet (2005). O programa Clumpp v. 1.1.2b (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) sumarizou os resultados das 10 simulações realizadas para o número K de agrupamentos mais prováveis. A representação em gráficos de barra dos resultados foi gerada no Microsoft Excel.

Para observar a delimitação geográfica entre os sistemas de mata e quintais, foi aplicado o modelo espacial com alelos correlacionados e presença de alelos nulos no pacote Geneland (version 4.0) (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005) utilizando o plataforma R (R Development Core Team, 2011). O algoritmo do Geneland é similar ao Structure para definição dos agrupamentos, por meio da maximização do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o equilíbrio de ligação. Sua diferença ocorre em como estimar o número K de populações, pois incorpora as coordenadas espaciais dos indivíduos nos procedimentos de modelagem (RUTLEDGE et al., 2010). Dessa forma, para evitar a superestimação de populações, foi utilizado K igual ao número de populações inferidas pelo Structure. Foi assumida a certeza nas coordenadas espaciais e utilizados os parâmetros de 500.000 iterações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) a cada 100 observações. Com esses parâmetros foram realizadas dez corridas independentes. Desse grupo, a corrida com o maior log de probabilidade posterior de pertencimento a uma população foi escolhido para análises subsequentes. O mapa de estimada associação de agrupamento populacional em pixels foi calculado com um burn-in de 200 iterações, como sugerido no manual (THE GENELAND DEVELOPMENT GROUP, 2012) e o número de pixels foi definido para 20 x 25 ao longo dos eixos x e y por se tratar de uma representação da área da FLONA do Tapajós de 20 km x 25 km. Por fim, a probabilidade posterior de pertencer a um grupo também foi calculada e representada em pixels, na forma de mapa.

Como forma de avaliar mais profundamente a estrutura genética e devido ao fato de que análises Bayesianas feitas com o Structure e Geneland possuem fortes pressupostos genéticos, como aderência ao EHW e minimização do desequilíbrio de ligação, foram também realizadas Análises Discriminantes de Componentes Principais (Discriminant

Analysis of Principal Components – DAPC) (JOMBART et al., 2010) com o pacote Adegenet v.1.3.1 (JOMBART; AHMED, 2011) para a plataforma R 3.4.3 (R Development Core Team, 2017). O DAPC é um método multivariado que combina a Análise dos Componentes Principais (Principal Component Analysis -PCA) e a Análise Discriminante (Discriminant Analysis - DA). O DAPC usa o PCA como um primeiro passo para o DA, o que assegura que as variáveis submetidas ao DA não sejam correlacionadas (JOMBART et al., 2010) e, dessa forma, maximiza a variação entre grupos e diminui a variação dentro dos grupos. A DAPC foi realizada de duas maneiras: 1) utilizando o método K-means, que consiste em sucessivas corridas para aumento do número de agrupamentos (K), depois de transformar os dados usando a PCA. Para cada modelo é calculada uma medida estatística de adequação (Bayesian Information Criterion, BIC), que permite escolher o melhor K (JOMBART et al., 2010). Após isso, é definido o melhor número de PCAs retidas por meio da função α -score e assim gerados os gráficos scatter e compplot; 2) a DAPC também foi realizada considerando os dois possíveis sistemas (mata e quintal) existentes como agrupamentos genéticos “pré-definido”, tendo sido novamente utilizado o α -score para a melhor retenção de PCAs e para gerar os gráficos. As probabilidades de adesão de um indivíduo em diferentes grupos são semelhantes aos resultados de ancestralidade obtidos no Structure e por isso podem ser comparadas.

Foi também realizada uma análise de agrupamento, com a distância genética proposta por Nei (NEI, 1972) e o método aglomerativo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages), utilizando o pacote poppr (KAMVAR; TABIMA; GRÜNWALD, 2014) para o plataforma R 3.4.3 (R Development Core Team, 2017), com intervalos de confiança baseados em 1000 replicações bootstrap. O dendrograma foi formado no programa no FigTree 1.4.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). A dispersão da diversidade genética entre os possíveis sistemas (mata vs quintais) foi avaliada por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de grupos (mata e quintais), foi realizada a partir da análise molecular de variância “locus-by-locus” (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). Ambas as análises foram realizadas no software GenAlex v. 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A AMOVA foi conduzida com 10.000 permutações. O fluxo gênico Nm foi calculado a partir do F_{ST} em que $Nm = \frac{1}{4}(1/F_{ST}-1)$ (WRIGHT, 1951).

2.3. Resultados

2.3.1. Diversidade genética

Os sete locos SSR amplificaram e apresentaram polimorfismo. Foram encontrados 68 alelos (A) em quintais, sendo a riqueza alélica (Ar) igual a 8,4 e o número de alelos efetivos (Ne) igual a 5,8 (Tabela 1). Altos níveis de heterozigosidade esperada foram encontrados, entretanto a heterozigosidade observada foi menor que a esperada em ambos os locais, o que reflete em um forte e positivo coeficiente de endogamia ($f = 0,283$), indicando excesso de homozigotos. Os cinco locos com presença de alelos nulos não estavam em EHW, enquanto os dois locos sem alelos nulos estavam.

Indivíduos da mata apresentaram maior número de alelos ($A = 98$), riqueza alélica ($Ar = 12,87$) e alelos efetivos ($Ne = 6,51$) do que os cultivados em quintais (Tabela 1). A heterozigosidade esperada (H_E) foi de 0,83, próximo ao apresentado pelos quintais, e a observada (H_O) foi 0,66, um pouco maior que o dos quintais ($H_o = 0,59$). Em relação ao EHW, não foram observados equilíbrio em três dos sete locos em indivíduos de mata e em cinco locos dos piquizeiros de quintal. O coeficiente de endogamia foi inferior na mata ($f = 0,205$) em relação aos quintais ($f = 0,283$). Tanto a mata como os quintais apresentaram alelos nulos, em cinco diferentes locos, o que pode contribuir para o aumento de homozigosidade nas análises.

Tabela 1. Diversidade genética de piquiá (*Caryocar villosum*) presente nos quintais de duas comunidades e na mata na FLONA do Tapajós, avaliada com sete locos de microssatélites, e pelos parâmetros: N = número de indivíduos, A = número de alelos, Ar = riqueza alélica, Ne = número de alelos efetivos, H_O = heterozigosidade observada, H_E = heterozigosidade esperada, EHW = equilíbrio de Hardy-Weinberg, f = índice de Fixação. ** alelos nulos com 5 % de significância.

Quintais								
Locos	cb11	cb5	cb20	cb6	cb9	cb3	cb23	Total/Média
N	25,00	25,00	25,00	25,00	24,00	25,00	23,00	24,57
A	8,00	11,00	9,00	10,00	9,00	9,00	12,00	68,00
Ar	7,56	10,28	7,89	9,04	8,64	8,33	10,98	8,96
Ne	3,96	5,63	4,25	6,04	6,62	5,79	8,53	5,83
H_O	0,68	0,44	0,40	0,68	0,67	0,76	0,48	0,59
H_E	0,75	0,82	0,76	0,83	0,85	0,83	0,88	0,82
EHW (p -valor)	0,75	0,00	0,00	0,00	0,01	0,09	0,00	0,00
f	0,09	0,47	0,48	0,19	0,22	0,08	0,46	0,28
Alelos Nulos	0,03	0,22**	0,24**	0,10**	0,10**	0,03	0,23**	
Mata								
Locos	cb11	cb5	cb20	cb6	cb9	cb3	cb23	Total
N	67,00	67,00	66,00	67,00	66,00	65,00	57,00	65,00
A	11,00	16,00	11,00	13,00	10,00	16,00	21,00	98,00
Ar	10,79	14,07	9,93	11,79	9,57	14,29	19,67	12,87
Ne	4,31	5,28	6,10	4,38	6,32	7,82	11,38	6,51
H_O	0,63	0,46	0,89	0,60	0,71	0,83	0,49	0,66
H_E	0,76	0,81	0,84	0,77	0,84	0,87	0,91	0,83
EHW (p -valor)	0,31	0,00	0,16	0,08	0,44	0,04	0,00	0,00
f	0,18	0,43	-0,07	0,23	0,15	0,05	0,46	0,21
Alelos Nulos	0,09**	0,22**	-0,04	0,13**	0,08**	0,02	0,23**	

Apesar da mata apresentar maior valor de H_O em relação aos quintais, o desvio padrão encontrado em ambos os valores é grande, de tal forma que a diferença entre os dois é minimizada. Mesmo assim foi observado um decaimento em relação ao H_O , número de alelos, riqueza alélica, número de alelos efetivos e alelos privados da mata para os quintais (Figura 6).

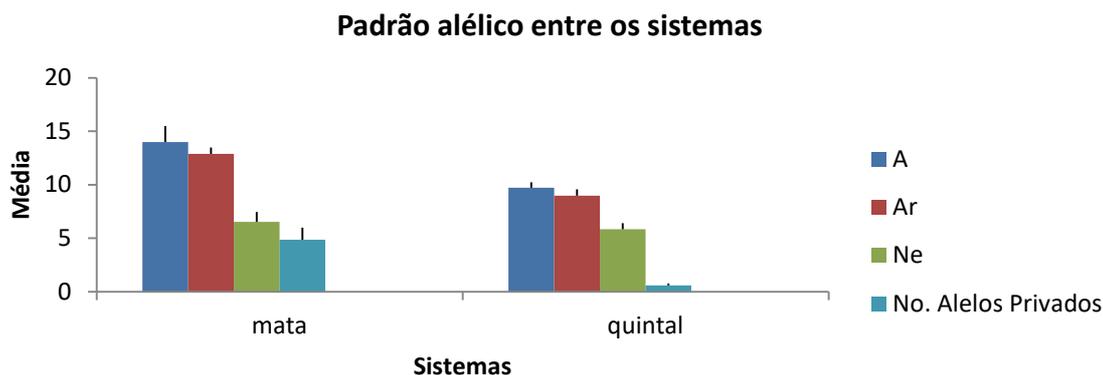


Figura 6. Diversidade alélica de piquiá (*Caryocar villosum*) entre os sistemas mata e quintais da FLONA do Tapajós, representada por meio dos parâmetros de número de alelos (A), riqueza alélica (Ar), alelos efetivos (Ne), número de alelos privados e heterozigidade observada (H_o). As linhas sobre as barras dos parâmetros representam os desvios padrões.

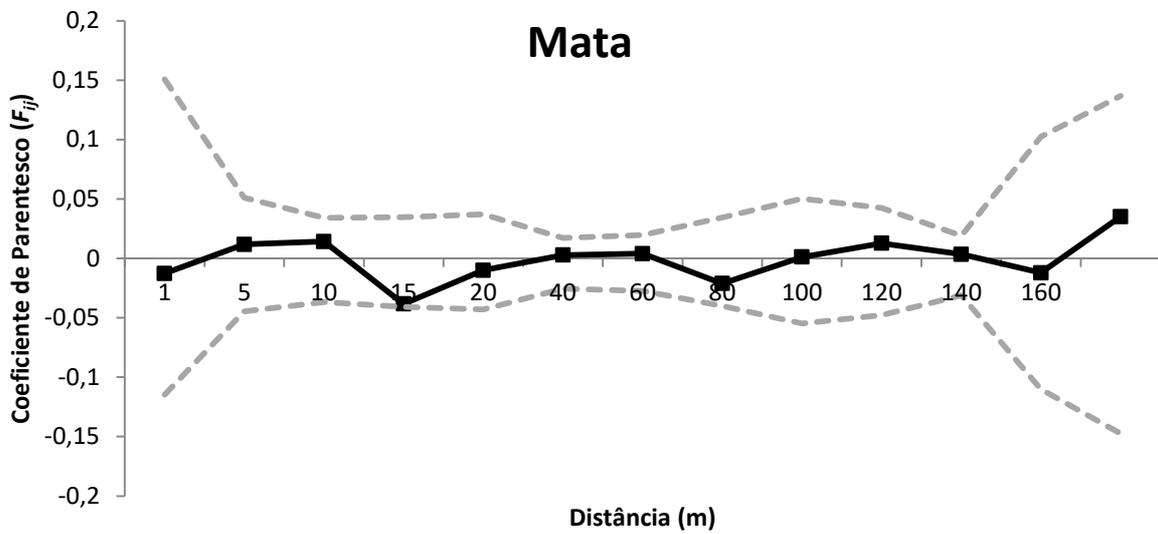
2.3.2. Estrutura Genética Espacial

Os indivíduos que pertencem à mata (Figura 7A) não apresentaram estrutura genética espacial significativa, sendo que o $b\text{-log}$ foi de $-0,0038$ e a estatística Sp apresentou valor de $0,004$. Já os indivíduos presentes em quintais (Figura 7B) apresentaram estruturação genética espacial até, aproximadamente, 4 metros, com o coeficiente de parentesco (F_{ij}) variando entre $0,02$ e $0,06$. O $b\text{-log}$ foi de $-0,01137$ e a estatística Sp apresentou valor superior ao encontrado na mata, de $0,012$.

2.3.3. Estrutura genética

Utilizando as 92 plantas, o número de agrupamentos mais provável encontrado a partir da análise Bayesiana pelo programa *Structure* foi $K = 2$ (Figura 8A), sendo que o método indicou também a possibilidade $K = 3$ e $K = 4$. Entretanto, a partir de $K = 3$ não foi observada estruturação dos grupos. Para $K = 2$, considerando o limite de pelo menos 70 % de probabilidade de ancestralidade em um dos agrupamentos ($q \geq 0,7$), 15 dos 25 plantas (60 %) de quintais pertencem ao grupo 2 (vermelho, Figura 8B), mostrando predominância de ancestralidade nesse grupo. Já 25 dos 67 plantas consideradas de mata (37,3 %) pertencem ao grupo 1 (azul, Figura 8B). Na mata existem também 25 indivíduos (37,3 %) com níveis intermediários de ancestralidade, ou seja, aquelas que apresentaram $q < 0,7$ para ambos os grupos.

A)



B)

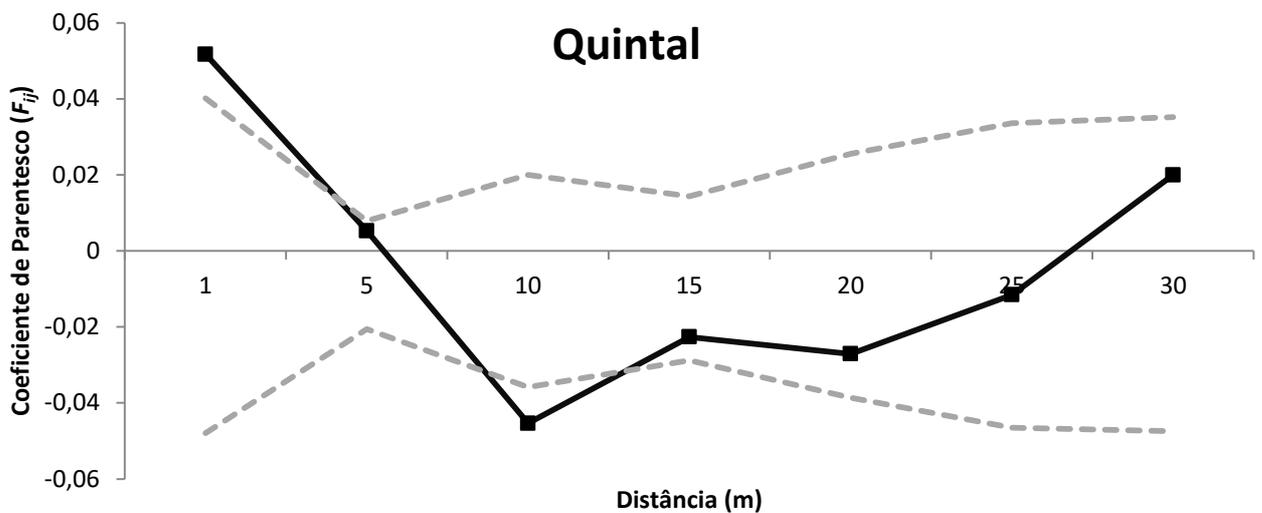
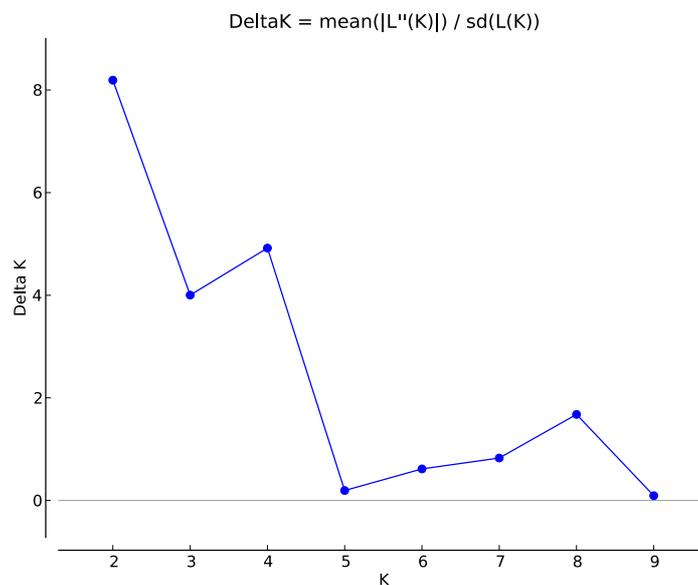


Figura 7. Estrutura genética espacial presente entre indivíduos da mata (A) e dos quintais (B). As linhas sólidas representam o F_{ij} estimado médio e as linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 95 % do F_{ij} médio calculado com 20.000 permutações.

A)



B)

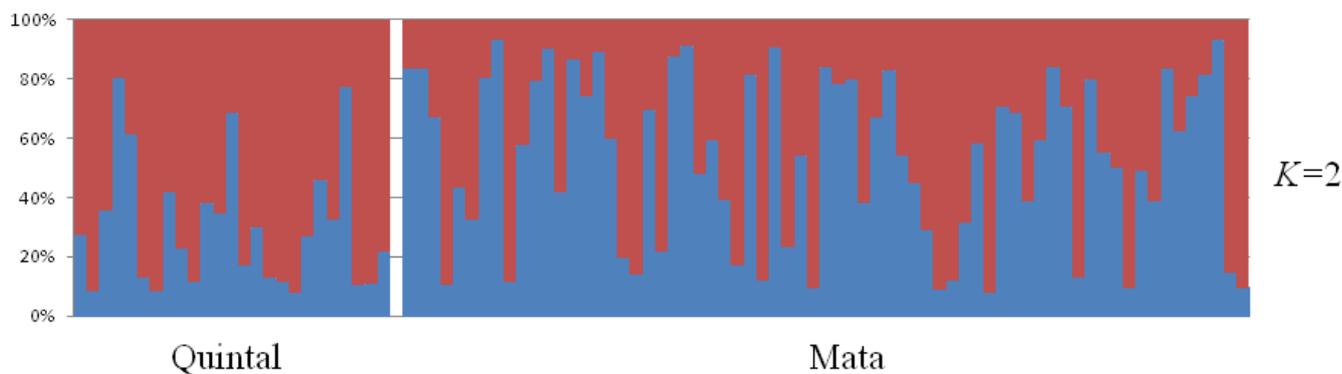


Figura 8. Estrutura genética encontrada entre piquiazeiros (*Caryocar villosum*) de quintais e mata na FLONA do Tapajós com base em sete locos microssatélites. A) Gráfico baseado no delta K calculado de acordo com Evanno et al. (2005) para estimar o número de grupos nos 92 indivíduos amostrados. B) Distribuição dos 92 indivíduos de *C. villosum* em dois ($K = 2$) grupos usando o método Bayesiano de análise de estrutura de populações com o *Structure* (PRITCHARD et al., 2000). Cada barra sólida representa um indivíduo, e as duas cores correspondem às probabilidades de pertencer a um grupo ou outro.

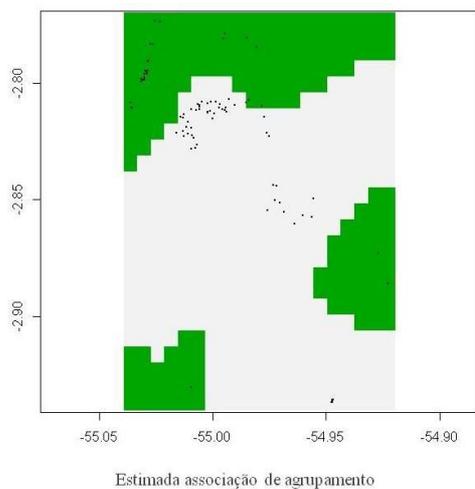
Uma forma de visualizar espacialmente as diferenças entre quintais e mata foi utilizando o GENELAND e assumindo $K = 2$, encontrado no *Structure*. É possível observar a separação entre os quintais com grande parte dos indivíduos da mata e que determinados piquiazeiros da mata se assemelham mais com os de quintais, compartilhando o mesmo mosaico, ou grupo, entre eles (Figura 9A). Esses resultados são consistentes com os

encontrados no *Structure* (Figura 8B), visto que 17 indivíduos (25,4 %) de mata são pertencentes ao grupo 2 (vermelho), predominante no sistema quintal. Os piquizeiros da mata que foram agrupados junto aos de quintais apresentaram probabilidade posterior de agrupamento, ou compartilhamento de alelos, entre 0,5-0,8, enquanto indivíduos dos quintais apresentaram, entre si, uma probabilidade posterior de agrupamento de 0,8-0,9 (Figuras 9B).

As DAPCs revelaram resultados parecidos com ambas as análises Bayesianas. Por meio do método *K-means* e o α -score, para reter o melhor número de PCAs na DAPC1, foram detectados $K = 3$ agrupamentos (Figura 10A), que não seguiram as divisões mata/quintal, em que os indivíduos ficaram agrupados de acordo com suas semelhanças genéticas. Também foi realizada a DAPC2 (Figura 10B), com a separação mata e quintal pré-definidas, por essa representar com acurácia e de forma mais simples a separação entre os indivíduos (Tabela 3).

Considerando o mesmo limite arbitrário aplicado na análise do *Structure*, com pelo menos 70 % de probabilidade de ancestralidade em um dos agrupamentos ($q \geq 0,7$), foi visto no DAPC1 todos os 92 indivíduos serem classificados em um dos três grupos (Tabela 2, Figura 10A). Nos quintais, 60 % dos indivíduos pertenceram ao grupo 2, e na mata, aproximadamente 42 % dos piquizeiros foram classificados no grupo 1, e 31 % no grupo 3. Como visto no resultado da análise Bayesiana, boa parte dos indivíduos da mata eram de moderada ancestralidade, sendo que esses indivíduos formaram um terceiro grupo no DAPC1, junto a mais três indivíduos de quintal (Tabela 2, Figura 10A)

A)



B)

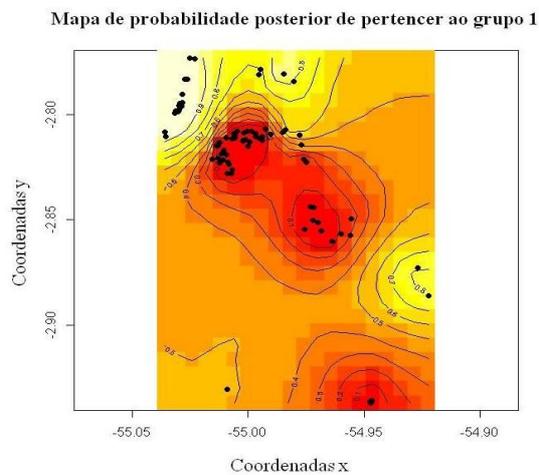


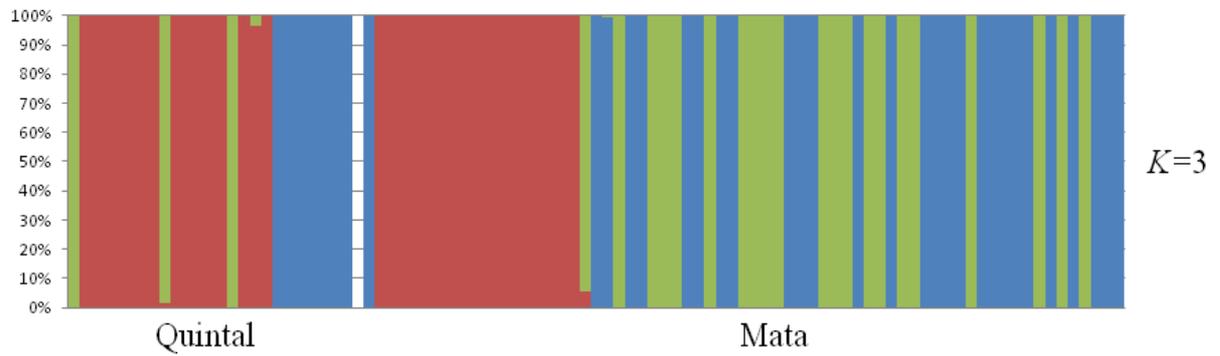
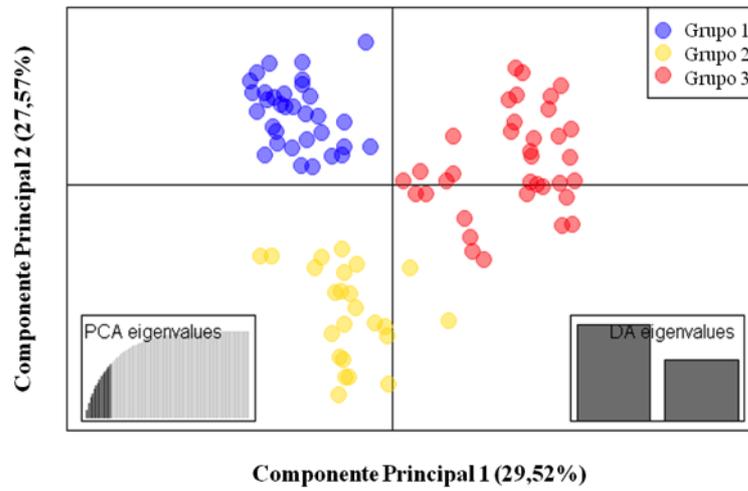
Figura 9. Agrupamento espacial Bayesiana com o programa GENELAND. Os pontos representam cada indivíduo de *C. villosum* genotipado na FLONA do Tapajós. A) O agrupamento espacial mostra os dois agrupamentos ($K = 2$) inferidos pelo *Structure*. B) Mapa de probabilidade posterior de pertencer ao grupo 1 (mata) da FLONA do Tapajós.

Tabela 2. Distribuição dos indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*) na FLONA do Tapajós entre os agrupamentos formados pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), baseado em sete locos SSR, sem considerar os grupos mata e quintal (DAPC1) e com os grupos pré-definidos para a análise (DAPC2). Grupo 1: azul; grupo 2: vinho; grupo 3: verde

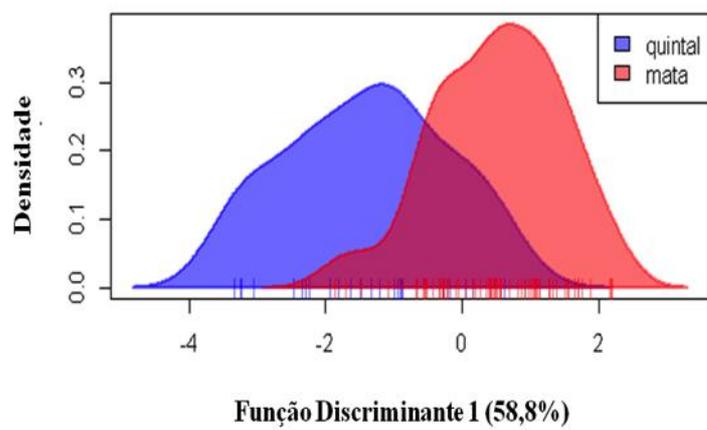
Local/Grupo	DAPC1			DAPC2	
	1	2	3	1	2
Quintal	7	15	3	6	14
Mata	28	18	21	63	4

No DAPC2, realizado com os sistemas quintal e mata pré-definidos ($K = 2$), é possível notar que há uma separação mais clara entre os sistemas (Figura 10B) do que a encontrada no *Structure* (Figura 8B). Utilizando $q \geq 0,7$ para definir a ancestralidade, é visto que 56 % dos piquiás de quintal pertencem ao grupo 2 (vinho) e que 94 % dos indivíduos de mata pertencem ao grupo 1 (azul) (Tabela 2; Figura 10B). Os dois métodos aplicados na DAPC mostram uma sobreposição de grupos entre os sistemas quintal e mata, porém o DAPC2, com os sistemas pré-definidos, apresentou o maior sucesso em separá-los, visto que definiu melhor os indivíduos da mata em um grupo.

A)



B)



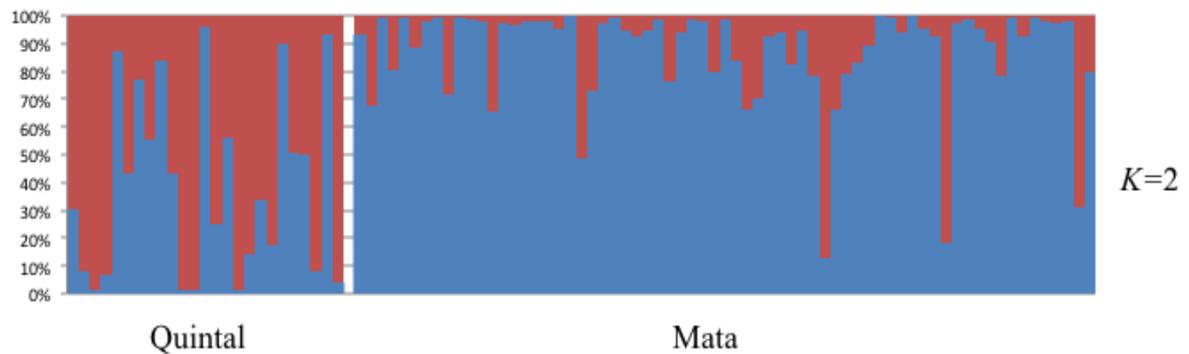


Figura 10. Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) com base em 7 locos de microssatélites para os 92 indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*) na FLONA do Tapajós. A) Gráficos *scatter* e *compplot* feitos utilizando a DAPC1, em que foram encontrados $K = 3$ grupos, independentes dos sistemas mata/quintal. B) Gráficos *scatter* e *compplot* baseados na DAPC2, com $K = 2$ grupos bem definidos, utilizando os sistemas mata/quintal pré-definidos na análise.

A projeção dos 92 indivíduos em um plano bidimensional definido pela primeira coordenada principal, que explicou 22,7 % da variação, e pela segunda coordenada principal, que explicou 21 % da variação total (Figura 11), deixou clara a sobreposição dos piquiazeiros dos quintais em relação aos de mata. Entretanto, a primeira coordenada mostrou que os indivíduos de quintais se assemelham mais aos de mata presentes nos quadrantes da esquerda do que aos piquiazeiros de mata dos quadrantes da direita, visto que 72 % dos indivíduos dos quintais se encontram nos quadrantes da esquerda.

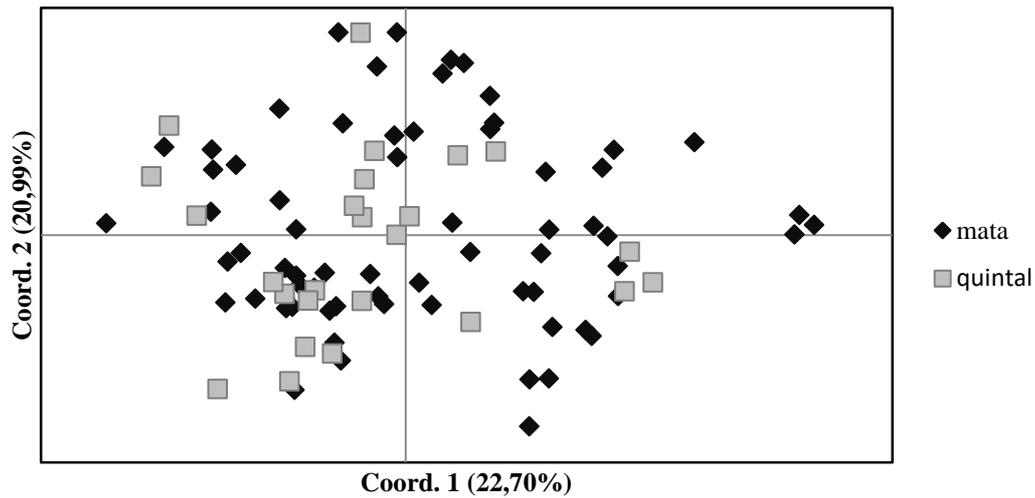


Figura 11. Análise de coordenadas principais (PCoA) para os 92 indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*) na FLONA do Tapajós, baseado em sete marcadores microssatélites.

O dendrograma UPGMA com base em distância de Nei mostrou uma clara separação dos 92 piquiazeiros em dois ramos principais, formados em 100 % das 1000 repetições *bootstraps* (Figura 12). Observa-se que há uma predominância de piquiazeiros dos quintais junto aos de mata no ramo com maior número de indivíduos, o que se assemelha ao encontrado nos quadrantes da esquerda da PCoA (Figura 11). Todas as análises mostraram que há maior proximidade ou agrupamento entre os piquiazeiros dos quintais com determinados piquiazeiros da mata. Entretanto, as análises Bayesianas feitas com o GENELAND e a análise multivariada DAPC2 tiveram a maior capacidade em separar esses dois sistemas. O pacote GENELAND, por utilizar a análise Bayesiana somada ao componente geográfico, conseguiu melhor definir quais piquiazeiros de mata são semelhantes aos de quintais, enquanto o DAPC2 conseguiu formar o grupo de mata mais bem definido entre todas as análises, porém o DAPC1 é onde melhor se visualiza os indivíduos intermediários.

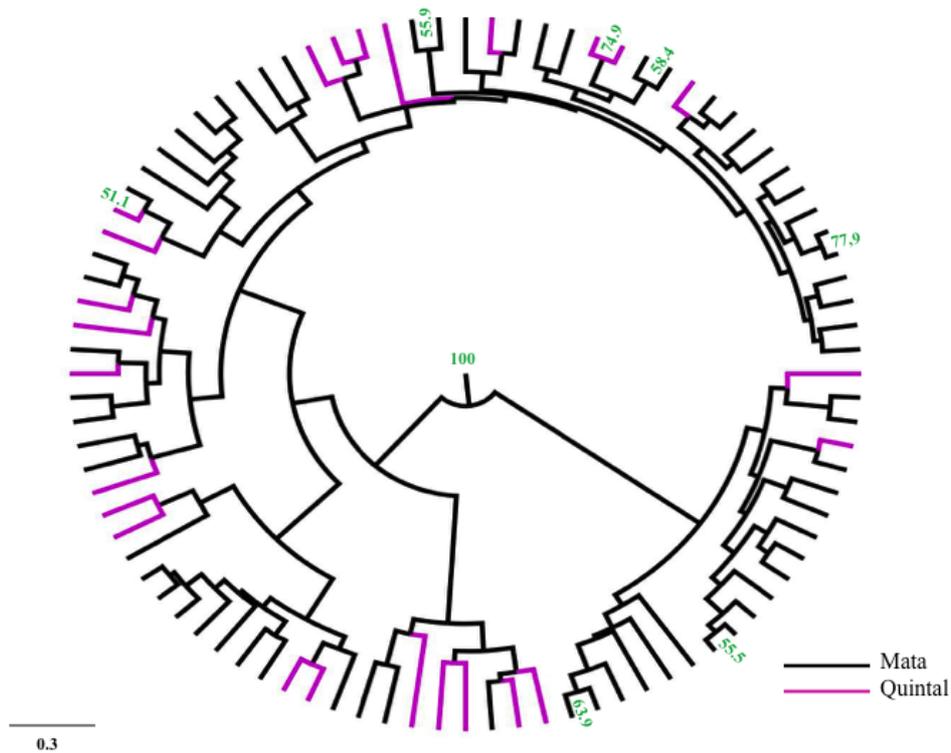


Figura 12. Dendrograma realizado com a distância proposta por Nei (1972) e método UPGMA, com os 92 indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*) da FLONA do Tapajós, baseado nos resultados de sete marcadores microssatélites. Os números em verde representam as repetições *bootstraps* usadas para formar os grupos ou ramos.

A AMOVA foi feita considerando todos os 92 indivíduos, separados nos dois sistemas ecológicos (mata e quintal). A separação entre os sistemas foi baixa, porém estatisticamente significativa ($F_{st} = 0,024$; $p = 0,0001$). A AMOVA também mostrou que a maior proporção da variação é encontrada dentro dos sistemas (97,64 %) (Tabela 3). Foi verificado que o fluxo gênico entre os dois sistemas é muito alto ($Nm = 10,32$), o que contribui para que a diferença entre os sistemas seja baixa e para a distância geográfica não influenciar na diversidade genética.

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) baseado em sete locos microssatélites e 92 indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*) nos dois sistemas (quintal/mata) na FLONA do Tapajós. F_{ST} indica a diferenciação entre os grupos.

Fonte	Graus de liberdade	Média dos Quadrados	Variância	% da variação	F_{ST}
Entre os sistemas	1	8,114	0,071	2,36%	0,024 ($p = 0,001$)
Dentro dos sistemas	182	2,936	2,936	97,63%	
Total	183		3,007	100,00%	

2.4. Discussão

2.4.1. Diversidade genética

A domesticação do piquiá pode estar relacionada ao processo de domesticação da população, da paisagem, ou por ambos os processos. Acredita-se que *C. villosum* encontra-se entre as 83 espécies que sofreram domesticação antes da conquista europeia e encontra-se incipientemente domesticada (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016; LEVIS et al., 2017). Sabe-se que nas comunidades da FLONA, os moradores estão realizando a seleção dos piquiás mais doces para plantá-los nos quintais. Porém, essa seleção pode estar sendo enfraquecida com a ocorrência da seleção não-intencional, por ocasião da extração de óleo, que envolve o descarte de sementes no solo, as quais são enterradas para evitar acidentes devido a exposição dos espinhos do endocarpo (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016).

Avaliando a diversidade genética encontrada nos piquiazeiros nessas comunidades, é possível compara-la com a de outras espécies também consideradas incipientemente domesticadas. Clement (1999a) apontou 45 espécies com populações incipientemente domesticadas na era pré-Colombiana na Amazônia, incluindo o piquiá (*C. villosum*). Entre as 45 espécies, 16 apresentam trabalhos de diversidade genética utilizando marcadores microsatélites (Anexo 1). Resultados similares de heterozigidade observada (H_o), entre 0,55 – 0,69, são encontrados em nove espécies, dentre as 16, consideradas incipientemente domesticadas. Entre elas estão *Hevea* spp. (LE GUEN et al., 2009, 2011; SOUZA et al., 2009; TRIWITAYAKORN et al., 2011; DE SOUZA et al., 2015), *Bertholletia excelsa* (SUJII et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2017) e *Hymenaea courbaril* (CIAMPI et al., 2008; DE LACERDA; KANASHIRO; SEBBENN, 2008; FERES et al., 2009; SILVA et al., 2014).

Considerando a seleção recente do piquiá na FLONA do Tapajós, verificou-se um leve decaimento nos parâmetros de diversidade como a heterozigidade observada (H_o), que na mata foi de 0,66 e nos quintais foi 0,59, e na riqueza alélica (A_r) que passou de 12,87 na mata, para 8,96 nos quintais. Esta diminuição da diversidade genética pode estar refletindo um efeito de seleção antrópica sobre o piquiá, porém sutil, provavelmente balanceado pela seleção não-intencional de frutos (descarte durante a extração de óleo) também feita pelos moradores. Alguns estudos comparando indivíduos silvestres e cultivados de espécies consideradas incipientemente domesticadas já foram realizados, utilizando marcadores microsatélites. Ambos os estudos de Hollingsworth et al. (2005) com *Inga edulis* e Arias et al. (2015b) em *Pouteria sapota* encontraram baixos níveis de diferenciação entre as populações cultivadas e silvestres. No caso do *I. edulis*, os autores não observaram

divergência entre as heterozigosidades esperadas (H_E), porém foram vistas diferenças em relação ao número de alelos. Com a *P. sapota*, os indivíduos cultivados apresentaram maior valor de heterozigosidade observada ($H_O = 0,39$) do que os silvestres ($H_O = 0,32$). A variação na frequência alélica observada no piquiá pode também ser resultado do processo de deriva genética, pois pode estar ocorrendo o efeito fundador para a população de piquiazeiros de quintais. Segundo Ladizinsky (1998), quando um pequeno número de indivíduos dá origem a uma população de plantas domesticadas e cultivadas há um claro exemplo de efeito fundador, o qual tem um importante papel na evolução de plantas, principalmente nos estágios iniciais de domesticação, que é o caso do piquiá.

É esperado que espécies com populações incipientemente domesticadas tenham relativamente baixa diferenciação fenotípica e genética entre indivíduos silvestres e cultivados (LINS NETO et al., 2014). Os autores afirmam que a baixa diferenciação entre silvestres e cultivados ocorre devido ao grande fluxo gênico entre os indivíduos (HOLLINGSWORTH et al., 2005; ARIAS et al., 2015). A mesma explicação pode ser dada para os *C. villosum* cultivados em quintais e encontrados em mata, já que o fluxo gênico entre os dois sistemas é muito alto ($Nm = 10,32$). Outro fator que pode contribuir para manter ou aumentar a diversidade em espécies com populações consideradas incipientemente domesticadas é a contínua substituição de indivíduos nas plantações, assim como a inclusão de tipos dessa espécie de outras vilas (LINS NETO et al., 2014).

2.4.2. Estrutura genética espacial

A estrutura genética espacial pode ser influenciada por fatores como o fluxo gênico, sistema de cruzamento, densidade populacional quando sementes e pólen ficam próximos a árvore matriz, e gerações que se sobrepõem (COELHO et al., 2018). Segundo Martins e Gribel (2007), flores como as de *C. villosum* são polinizadas principalmente por morcegos da família Glossophaginae e *Phyllostamus discolor*. Collevatti et al. (2009) relataram que o Rio Negro não é considerado uma barreira geográfica para *C. villosum*. Os polinizadores da espécie conseguem ultrapassar essa distância e, assim, não ocorre diferenciação entre indivíduos dos dois lados do rio. Entretanto, esse comportamento não foi observado em árvores de *C. brasiliense* (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001a, 2001b) que possui os mesmos polinizadores e dispersores do piquiá. O sistema de cruzamento, embora ainda não tenha sido estudado para *C. villosum*, já foi estudado para a *C. brasiliense*, em que foi constatado a presença de autocompatibilidade em baixa frequência (11,4 % das sementes)

(COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001c). Por serem espécies próximas, é possível que este tipo de cruzamento também ocorra em *C. villosum*. A densidade populacional na FLONA de Tapajós é de 2,52 árvores/ha ($DP \pm 0.45$), três vezes maior do que a densidade média de indivíduos encontrada em outras quatro localidades (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016), o que pode aumentar o cruzamento entre parentes.

Os resultados, entretanto, mostram que não há estrutura genética espacial (EGE) entre os indivíduos da mata (Figura 7A), sugerindo que nesse local a polinização e a dispersão de sementes estão sendo eficientes em evitar a estruturação da população, superando até mesmo possíveis estruturações causadas por um sistema de cruzamento misto e pelo adensamento de piquiazeiros. Entretanto, uma baixa, porém significativa estrutura genética espacial é vista entre indivíduos cultivados nos quintais. Nos resultados encontrados, a coancestria ou coeficiente de parentesco foi próxima a $F_{ij}=0,06$, valor inferior ao esperado para meios-irmãos ($F_{ij}=0,125$) (WEIR; COCKERHAM, 1984). É possível que a estruturação encontrada nos quintais seja resultado da seleção feita pelo homem, pela escolha de frutos adocicados. Alguns frutos presentes nos quintais podem ser da mesma árvore ou de árvores com características semelhantes, de tal forma que, quando avaliados espacialmente, sejam encontradas relações de parentesco.

De maneira semelhante, em um estudo feito com a espécie também incipientemente domesticada *Acrocomia aculeata*, a única comunidade analisada que não apresentou EGE foi aquela com mais baixa intervenção das atividades de famílias rurais (COELHO et al., 2018). Segundo os autores, a intervenção humana nas outras comunidades estudadas pode resultar em barreiras para polinização e ausência de dispersores. No caso da *C. villosum*, a restrição em um ambiente como o quintal, próximo a moradias e dentro de comunidades, pode resultar na diminuição do fluxo gênico a longo prazo e no aumento dos casos de autopolinização, o que irá acentuar estruturação genética espacial.

Outra causa da estruturação encontrada em quintais pode ser o evento de seleção e estabelecimento recente dos indivíduos nesse local. Collevatti e Hay (2011) afirmam que *C. brasiliense* é uma árvore de vida longa, que tem potencial para sobreviver por mais de 200 anos. Pelas similaridades entre as duas espécies, é possível que o ciclo de vida de *C. villosum* também seja superior a 200 anos e que a seleção entre quintal e mata, seja inferior a esse tempo, sendo os indivíduos de quintais mais jovens. Como foi visto no estudo realizado em *C. brasiliense* (COLLEVATTI; HAY, 2011) e em *Copaifera langsdorffii* (SEBBENN et al., 2011), indivíduos juvenis apresentam maior estruturação genética espacial por refletirem eventos recentes de dispersão de pólen e sementes, enquanto adultos são resultados de

acontecimentos históricos de dispersão e competição. Comparados com indivíduos estabelecidos há longo prazo nas matas, é evidente que a seleção natural e a competição ainda não tenham causado diminuição na estrutura populacional nos quintais.

2.4.3. Estrutura genética

As simulações com o programa *Structure* apontaram para a existência de dois grupos de piquiás, porém com baixa estruturação dentro desses grupos. A baixa definição entre os dois grupos resultou na presença de indivíduos intermediários aos dois grupos. Estas plantas são melhor visualizadas na análise DAPC1, sem pré-definição de grupos, onde os indivíduos intermediários formam um grupo, resultando em $K = 3$. A baixa estruturação entre os grupos mata e quintal também pode ser observada em análises como a PCoA e o dendrograma, em que os indivíduos dos diferentes sistemas encontram-se misturados. Entretanto, é possível notar também que os indivíduos de quintal encontram-se mais próximos geneticamente de determinados indivíduos da mata do que em relação à outros, sugerindo que essas árvores na mata possam ter características desejadas para a seleção humana.

O processo de domesticação de plantas ocorre a longo prazo e é resultado da capacidade de humanos de superar pressões de seleção natural com o propósito de manejar e cultivar plantas úteis (LEVIS et al., 2018). Habitantes da Amazônia atual que vivem em assentamentos pré-Colombianos herdaram conhecimento indígena, incluindo práticas de manejo que beneficiam plantas úteis e domesticadas. Como foi relatado por Alves, Levis e Clement (2016), uma série de práticas de manejo estão sendo aplicadas pelas comunidades tradicionais da FLONA com o intuito de promover o piquiá, como por exemplo, o corte de lianas, zelo durante o corte de outras espécies, aplicação de matéria orgânica, entre outras práticas. Com isso, tem sido favorecidas árvores com frutos mais adocicados. A seleção por frutos doces é um padrão encontrado em espécies incipientemente domesticadas do México e Brasil (LINS NETO et al., 2014). Tais ações devem levar à transformação gradual na população. Entretanto, os resultados encontrados na AMOVA afirmam que, na região da FLONA, a população de piquiá ainda não passou por um processo de domesticação acentuado, de tal forma que ocorresse uma clara separação entre os sistemas, sendo baixa a variação (2.36 %) entre eles.

Situação semelhante tem sido observada na domesticação que está ocorrendo com o pequi (*C. brasiliense*) promovida por índios Kuikuro, no Xingu. É relatado que a percepção e avaliação fenotípica, durante o processo de seleção de sementes, estão afetando as frequências

gênicas das populações cultivadas de pequi, e assim, gerando o processo local de domesticação da planta. Porém, mesmo com a preferência positiva pelo fruto carnudo, as plantações têm como objetivo manter a diversidade fenotípica e ocorrem em proximidade dos pequizais cultivados. Tais ações permitem o fluxo gênico e incidem direta ou indiretamente na diversificação, afetando a manutenção morfológica das populações de pequi cultivadas (SMITH; FAUSTO, 2016). Da mesma forma, nos piquizeiros da FLONA do Tapajós, junto à seleção por frutos de sabor adocicado, ocorre o plantio de sementes que resultam da extração do óleo (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016). Entre os procedimentos citados para extração do óleo de *Caryocar* spp., é necessário ferver as castanhas, peneirar para extrair os espinhos junto ao endocarpo e, por fim, levar ao fogo baixo ou fritar para retirar o excesso de água e obter o óleo (DE ARAÚJO, 1995; SHANLEY; MEDINA, 2005). Neste processo, não há seleção de sementes de acordo com o sabor do fruto, mas para extração de óleo. Para evitar acidentes com os espinhos expostos do endocarpo, depois da extração de óleo, as sementes são enterradas no solo. As sementes que brotam, podem hibridizar com indivíduos selecionadas para frutos doces, o que reduz a resposta à seleção para ambas as finalidades (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016). Tal ação tem afetado a diversidade genética nos quintais. Aliado ao grande fluxo gênico ($Nm = 10,32$), o plantio acidental está contribuindo para não diferenciar profundamente os piquizeiros cultivados, resultando na baixa estruturação populacional. A presença de genótipos intermediários aos grupos, e a grande mistura entre os indivíduos mostram de forma clara que os piquizeiros de quintal ainda não possuem um genótipo particular que os façam ser considerados mais do que incipientemente domesticados.

Apesar da baixa estruturação entre os dois sistemas, devido à recente seleção do piquiá plantado em quintais, não é possível negar a existência de um antigo processo de domesticação da espécie na época pré-Colombiana. Evidência já apontada para essa ocorrência é a configuração adensada do piquiazal na FLONA (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016). Durante essa época, seres humanos tinham importante papel na disseminação de sementes de frutíferas dentro e ao longo de biomas Neotropicais (LEVIS et al., 2018), resultando em fragmentos associados a agrupamentos humanos e na atração de animais que dispersam mais sementes na área e aumentam a abundância da espécie. Piquizeiros são encontrados perto de áreas de terra preta de índio, assim atraem animais como *Cuniculus paca*, *Mazama americana*, *Priodontes* sp., e *Dasyprocta aguti* (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016), importantes para a caça humana. Tais ocorrências, junto a diversidade genética encontrada tanto em piquiá como em outras espécies consideradas incipientemente

domesticadas, levam à conclusão de que o piquiá pode ter sido manejado durante a época pré-Colombiana.

Os resultados deste estudo permitiram comparar a diversidade genética encontrada em piquiá de quintais e na mata, assim como determinar sua estrutura genética na FLONA de Tapajós, em que é possível observar que há diferenças entre piquizeiros cultivados e não-cultivados. Tais resultados, além de reportarem uma recente seleção relacionada ao cultivo nos quintais, mostram que é possível que *C. villosum* seja incipientemente domesticada na FLONA de Tapajós, visto sua configuração adensada e a heterozigosidade observada.

REFERÊNCIAS

- ADAMACK, A. T.; GRUBER, B. *PopGenReport*: simplifying basic population genetic analyses in R. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 4, p. 384-387, 2014.
- ALVES, R. P.; LEVIS, C.; CLEMENT, C. R. Use and Management of Piquiá Suggest in situ Domestication along the Lower Tapajós River, Brazilian Amazonia1. **Economic Botany**, v. 70, n. 2, p. 198–202, 2016.
- ARIAS, R. S.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; SOBOLEV, V. S.; BLANCARTE-JASSO, N. H.; SIMPSON, S. A.; BALLARD, L. L.; DUKE, M. V.; LIU, X. F.; IRISH, B. M.; SCHEFFLER, B. E. Development of a large set of microsatellite markers in zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) and their potential use in the study of the species. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11400–11417, 2015.
- BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; GIARDINI, A.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; BIAGETTI, E.; SANTILOCCHI, R.; SPAGNOLETTI ZEULI, P.; GIOIA, T.; LOGOZZO, G.; ATTENE, G.; NANNI, L.; PAPA, R. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytologist**, v. 197, n. 1, p. 300–313, 2013.
- CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 5, p. 1074–1077, 2008.
- CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R. Selected Species and Strategies To Enhance Income Generation From Amazonian Forests. Rome: Food and agriculture organization of the united nations, 1993. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/v0784e/v0784e00.htm>
- CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 188–202, 1999a.
- CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. II. Crop biogeography at contact. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 203–216, 1999b.

- COELHO, N. H. P.; TAMBARUSSI, E. V.; AGUIAR, B. I.; ROQUE, R. H.; PORTELA, R. M.; BRAGA, R. C.; SANSON, D.; SILVA, R. A. R.; FERRAZ, E. M.; MORENO, M. A.; KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Understanding genetic diversity, spatial genetic structure, and mating system through microsatellite markers for the conservation and sustainable use of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. **Conservation Genetics**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2018.
- COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, n. 6, p. 748–756, 1999.
- COLLEVATTI, R. G.; LEOI, L. C. T.; LEITE, S. A.; GRIBEL, R. Contrasting patterns of genetic structure in *Caryocar* (Caryocaraceae) congeners from flooded and upland Amazonian forests. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, n. 2, p. 278–290, 2009a.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349–356, 2001a.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, n. 1, p. 60–67, 2001b.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349–356, 2001c.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 1, p. 105–115, 2003.
- COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Seed abortion in the bat pollinated Neotropical tree species, *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). **Botany**, v. 87, n. 11, p. 1110–1115, 2009b.
- COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics and Genomes**, v. 6, n. 4, p. 555–564, 2010a.

- COLLEVATTI, R. G.; LIMA, J. S.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. de C. Spatial Genetic Structure and Life History Traits in Cerrado Tree Species: Inferences for Conservation. **Natureza & Conservação**, v. 08, n. 01, p. 54–59, 2010b.
- COLLEVATTI, R. G.; HAY, J. D. Kin structure and genotype-dependent mortality: A study using the neotropical tree *Caryocar brasiliense*. **Journal of Ecology**, v. 99, n. 3, p. 757–763, 2011.
- COOMES, O. T.; BAN, N. Cultivated Plant Species Diversity in Home Gardens of an Amazonian Peasant Village in Northeastern Peru. **Economic Botany**, v. 58, n. 3, p. 420–434, 2004.
- DE ARAUJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)—an economically valuable species of the central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, v. 49, n. 1, p. 40–48, 1995.
- DE LACERDA, A. E. B.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A. M. Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of a tropical tree *hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, v. 40, n. 4, p. 462–470, 2008.
- DE SOUZA, L. M.; GUEN, V. Le; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SILVA, C. C.; MANTELLO, C. C.; CONSON, A. R. O.; VIANNA, J. P. G.; ZUCCHI, M. I.; JUNIOR, E. J. S.; DE FREITAS FIALHO, J.; DE MORAES, M. L. T.; DE SOUZA GONCALVES, P.; DE SOUZA, A. P. Genetic diversity strategy for the management and use of rubber genetic resources: More than 1,000 wild and cultivated accessions in a 100-genotype core collection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015.
- DOS SANTOS, R. da S. O.; CAMPOS, T.; MARTINS, K.; HELENA, L.; WADT, D. O. Estrutura genética de duas populações naturais de *Bertholletia excelsa* Bonpl. sob exploração no Vale do Rio Acre. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)** v. 7, n. 3, p. 37–40, 2017.
- DOYLE, J. .; DOYLE, J. . Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- 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, 2012.
- EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 7, p. 832–839, 1996.

- ESPÍRITO-SANTO, F. D. B. **Caracterização e mapeamento da vegetação da região da Floresta Nacional do Tapajós através de dados óticos, radar e inventários florestais.** Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais-INPE. p. 277, 2003.
- 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.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1992.
- FERES, J. M.; GUIDUGLI, M. C.; MESTRINER, M. A.; SEBBENN, A. M.; CIAMPI, A. Y.; ALZATE-MARIN, A. L. Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Leguminosae), an endangered tropical tree: Recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, n. 6, p. 797–807, 2009.
- GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GENELAND: A computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 3, p. 712–715, 2005.
- HANCOCK JF. **Plant evolution and the origin of crop species.** 3 ed. Michigan- USA. CABI. 2012.
- HARDY, OLIVER J, & VEKEMANS, X. spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 618–620, 2002.
- HERNANDEZ FILHO, P.; CHUNG, D.; LEE, L. Metodologia de inventário multiestágio para floresta Tropical. **INPE**, São José dos Campos, p. 16, 1991.
- HOLLINGSWORTH, P. M.; DAWSON, I. K.; GOODALL-COPESTAKE, W. P.; RICHARDSON, J. E.; WEBER, J. C.; MONTES, C. S.; PENNINGTON, R. T. Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 497–501, 2005.
- IBAMA. Plano de Manejo - Floresta Nacional do Tapajós. v. 1, p. 2–165, 2004.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1801–1806, 2007.
- JOMBART, T.; AHMED, I. adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 3070–3071, 2011.

- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F.; et al. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, p. 94, 2010.
- KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRÜNWARD, N. J. *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ**, v. 2, p. e281, 2014.
- KANTAR, M. B.; NASHOBA, A. R.; ANDERSON, J. E.; BLACKMAN, B. K.; RIESEBERG, L. H. The Genetics and Genomics of Plant Domestication. **BioScience**, v. 67, n. 11, p. 971–982, 2017.
- KEENAN, K.; MCGINNITY, P.; CROSS, T. F.; CROZIER, W. W.; PRODÖHL, P. A. DiveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 8, p. 782–788, 2013.
- LADIZINSKY, G. **Plant evolution under domestication**. Springer Science & Business Media, 1998.
- LE GUEN, V.; DOARÉ, F.; WEBER, C.; SEGUIN, M. Genetic structure of Amazonian populations of *Hevea brasiliensis* is shaped by hydrographical network and isolation by distance. **Tree Genetics and Genomes**, v. 5, n. 4, p. 673–683, 2009.
- LE GUEN, V.; GAY, C.; XIONG, T. C.; SOUZA, L. M.; RODIER-GOUD, M.; SEGUIN, M. Development and characterization of 296 new polymorphic microsatellite markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Breeding**, v. 130, n. 2, p. 294–296, 2011.
- LEVIS, C.; COSTA, F. R. C.; BONGERS, F.; PEÑA-CLAROS, M.; CLEMENT, C. R.; JUNQUEIRA, A. B.; NEVES, E. G.; TAMANAHA, E. K.; FIGUEIREDO, F. O. G.; SALOMÃO, R. P.; CASTILHO, C. V.; MAGNUSSON, W. E.; PHILLIPS, O. L.; GUEVARA, J. E.; SABATIER, D.; MOLINO, J.-F.; CARDENAS LOPEZ, D.; TER STEEGE, H. Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition. **Science**, v. 931, n. March, p. 925–931, 2017.
- LEVIS, C.; FLORES, B. M.; MOREIRA, P. A.; LUIZE, B. G.; ALVES, R. P.; FRANCO-MORAES, J.; LINS, J.; KONINGS, E.; PEÑA-CLAROS, M.; BONGERS, F.; COSTA, F. R. C.; CLEMENT, C. R. How People Domesticated Amazonian Forests. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 5, n. January, 2018.
- LINS NETO, E. M. D. F.; PERONI, N.; CASAS, A.; PARRA, F.; AGUIRRE, X.; GUILLÉN, S.; ALBUQUERQUE, U. P. Brazilian and Mexican experiences in the study of incipient domestication. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2014.

- LOISELLE, B. a; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, n. 11, p. 1420–1425, 1995.
- MARTINS, R. L.; GRIBEL, R. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 37–45, 2007.
- NEI, M. Genetic Distance between Populations. **The American Naturalist**. v. 106, n. 949, p. 283–292, 1972.
- OLSEN, K. M.; WENDEL, J. F. A Bountiful Harvest: Genomic Insights into Crop Domestication Phenotypes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 47–70, 2013..
- 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, 2012.
- PRANCE, G. T.; DA SILVA, M. F. A Monograph of Caryocaraceae. **Flora Neotropica**, v. 12, p. 1–75, 1973.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, P.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.
- RADAMBRASIL. Projeto. Folha S/A 21-Santarém. **Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Produção Mineral-Levantamento de Recursos Naturais**, v. 10, p. 522, 1976.
- RUTLEDGE, L. Y.; GARROWAY, C. J.; LOVELESS, K. M.; PATTERSON, B. R. Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves. **Heredity**, v. 105, n. 6, p. 520–521, 2010.
- SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; DA SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 134–145, 2011.
- SILVA, S. M. M.; MARTINS, K.; MESQUITA, A. G. G.; WADT, L. H. O. Parâmetros genéticos para a conservação de *hymenaea courbaril* l. na amazônia sul-ocidental. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 87–95, 2014.

- SMITH, M.; FAUSTO, C. Sociality and diversity of pequi (*Caryocar brasiliense* Caryocaraceae) among the Kuikuro of the Upper Xingu river (Brazil). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 11, n. 1, p. 87–113, 2016.
- SOUZA, L. M.; MANTELLO, C. C.; SANTOS, M. O.; DE SOUZA GONÇALVES, P.; SOUZA, A. P. Microsatellites from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) for genetic diversity analysis and cross-amplification in six *Hevea* wild species. **Conservation Genetics Resources**, v. 1, n. 1, p. 75–79, 2009.
- SUJII, P. S.; MARTINS, K.; WADT, L. H. de O.; AZEVEDO, V. C. R.; SOLFERINI, V. N. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 4, p. 955–964, 2015.
- THE GENELAND DEVELOPMENT GROUP; GENELAND, T. Population genetic and morphometric data analysis using R and the Geneland program. p. 62, 2012.
- TRIWITAYAKORN, K.; CHATKULKAWIN, P.; KANJANAWATTANAWONG, S.; SRAPHET, S.; YOOCHA, T.; SANGSRAKRU, D.; CHANPRASERT, J.; NGAMPHIW, C.; JOMCHAI, N.; THERAWATTANASUK, K.; TANGPHATSORNRUANG, S. Transcriptome sequencing of *Hevea brasiliensis* for development of microsatellite markers and construction of a genetic linkage map. **DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 18, n. 6, p. 471–82, 2011.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.
- VAN OOSTERHOUT, C.; WEETMAN, D.; HUTCHINSON, W. F. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 255–256, 2006.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 921–935, 2004.
- VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal**. IBGE, 1991.
- VIEIRA, M. L. C.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. de F. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016.
- WEIR, B.S. AND COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358–1370, 1984.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 395–420, 1951.

Anexo 1. Lista de espécies consideradas incipientemente domesticadas por Clement (1999a) que possuem estudos de diversidade genética com marcadores moleculares (Heterozigosidade observada - H_O , heterozigosidade esperada- H_E).

Espécie	Família	Localização	H_E	H_O	Autor	Objetivo
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	Apocynaceae	N. E. Brazil	0.77	-	Rodrigues et al. (2015b)	Desenvolvimento de microsatélites
<i>C. villosum</i> (Aubl.) Pers.	Caryocaraceae	C. Amazônia/ Mata	0.83	0.66	Francisconi (2018)	Comparação da diversidade genética entre acessos de mata e quintal
<i>C. villosum</i> (Aubl.) Pers.	Caryocaraceae	<i>Quintal</i>	0.82	0.59	Francisconi (2018)	Comparação da diversidade genética entre acessos de mata e quintal
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	Amazônia	0.56	0.51	Triwitayakorn et al. (2011)	Transcriptoma do tecido foliar
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	Amazônia	0.55	0.42	Souza et al. (2009)	Desenvolvimento de microsatélites
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	Amazônia	0.74	0.6	Le Guen et al. (2009)	Quantificar a diversidade genética entre populações naturais
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	Amazônia	0.69	0.66	Le Guen et al. (2011)	Desenvolvimento de 296 microsatélites

Espécie	Família	Localização/ condição	H_E	H_O	Autor	Objetivo
<i>Bertholletia excelsa</i> H. & B.	Lecythidaceae	E. Amazônia	0.62	0.56	Sujii et al. (2015)	Avaliação da diversidade genética de populações de castanheiras
<i>Bertholletia excelsa</i> H. & B.	Lecythidaceae	E. Amazônia	0.57	-	Dos Santos et al. (2017)	Avaliação da diversidade genética de populações castanheiras
<i>Lecythis pisonis</i> Camb.	Lecythidaceae	Amazônia	0.86	0.69	Rodrigues et al. (2015a)	Desenvolvimento de microssatélites
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Leg. Caesalpinioideae	Amazônia	0.7	0.6	Lacerda, Kanashiro e Sebbenn (2008)	Efeitos do Corte de Impacto Reduzido na diversidade e estrutura genética espacial
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Leg. Caesalpinioideae	Amazônia	0.67	0.59	Carneiro et al. (2011)	Efeitos da exploração madeireira seletiva na diversidade genética
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Leg. Caesalpinioideae	Amazônia	0.84	0.69	Ciampi et al. (2008)	Desenvolvimento de microssatélites
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Leg. Caesalpinioideae	Amazônia	0.81	0.61	Feres et al. (2009)	Diversidade genética em banco de germoplasma

Espécie	Família	Localização/ condição	H_E	H_O	Autor	Objetivo
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Leg. Caesalpinioideae	Amazônia	0.73	0.63	Silva et al. (2014)	Definir parâmetros genéticos para conservação da espécie
<i>Inga edulis</i>	Leg. Mimosoideae	Amazônia / <i>Selvagem</i>	0.66	-	Hollingsworth et al. (2005)	Comparação da diversidade entre populações plantadas e naturais
<i>Inga edulis</i>	<i>Inga</i> spp. (numerous)	Amazônia/ <i>Cultivado</i>	0.67	-	Hollingsworth et al. (2005)	Comparação da diversidade entre populações plantadas e naturais
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Ribeirão Preto	0.81	0.47	Ferreira-Ramos et al. (2008)	Desenvolvimento de microssatélites
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Tambaú	0.82	0.42	Ferreira-Ramos et al. (2008)	Desenvolvimento de microssatélites
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	S. J. do Rio Preto	0.83	0.38	Ferreira-Ramos et al. (2008)	Desenvolvimento de microssatélites
<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lood	Palmae	E. Amazônia	0.51	0.27	Nucci et al. (2008)	Desenvolvimento de microssatélites
<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lood	Palmae	E. Amazônia	0.68	0.53	Lanes et al. (2013)	Determinar o nível de heterozigosidade entre adultos e jovens
<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lood	Palmae	E. Amazônia	0.39	0.2	Mengistu et al. (2016)	Desenvolvimento de SSR

Espécie	Família	Localização/ condição	H_E	H_O	Autor	Objetivo
<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lood	Palmae	E. Amazônia	0.73	0.52	Araújo et al. (2017)	Comparação da diversidade entre adultos, jovens e progênies, estudo da estrutura genética espacial e fluxo genético
<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lood	Palmae	E. Amazônia	0.79	0.37	Lanes et al. (2015)	Caracterização de banco de germoplasma ativo
<i>Elaeis oleifera</i> (H.B.K.) Cortés	Palmae	N.S. América	0.16	0.26	Zaki et al. (2012)	Desenvolvimento de microssatélites
<i>Elaeis oleifera</i> (H.B.K.) Cortés	Palmae	N.S. América	-	0.46	Arias et al. (2015a)	Examinar e estabelecer relações genéticas entre bancos de germoplasma
<i>Elaeis oleifera</i> (H.B.K.) Cortés	Palmae	N.S. América	-	0.5	Arias et al. (2015a)	Examinar e estabelecer relações genéticas entre bancos de germoplasma
<i>Euterpe oleracea</i> Mart.	Palmae	E. Amazônia	0.75	0.54	De Oliveira et al. (2010)	Caracterização de acessos de banco de germoplasma
<i>Oenocarpus bacaba</i> Mart.	Palmae	Amazônia	0.81	0.62	Lepsch-Cunha e Hamilton (2003)	Desenvolvimento de microssatélites
<i>Manikara huberi</i> (Huber) Standl.	Sapotaceae	Amazônia	0.81	0.69	Azevedo, Vinson e Ciampi (2005)	Desenvolvimento de microssatélites

Espécie	Família	Localização/ condição	H_E	H_O	Autor	Objetivo
<i>M. huberi</i> (Huber) Standl.	Sapotaceae	Amazônia	0.86	0.71	Azevedo et al. (2008)	Entendimento da diversidade genética em pop. naturais
<i>Pouteria sapota</i>	Sapotaceae	América do Norte <i>/Natural</i>	0.35	0.32	Arias et al. (2015b)	Desenvolvimento de microssatélites e estudo da estrutura e diversidade genética de <i>P. sapota</i>
<i>Pouteria sapota</i>	Sapotaceae	América do Norte/ <i>Cultivado</i>	0.41	0.39	Arias et al. (2015b)	Desenvolvimento de microssatélites e estudo da estrutura e diversidade genética de <i>P. sapota</i>
<i>Theobroma grandiflorum</i> Schum.	Malvaceae	E. Amazônia	0.61	0.34	Alves et al. (2007)	Diversidade genética e estrutura de populações naturais
<i>T. grandiflorum</i> Schum.	Malvaceae	E. Amazônia	0.68	0.6	Lemes et al. (2007)	Uso dos microssatélites de <i>T. cacao</i> em outras espécies <i>Theobroma</i>

Espécie	Família	Localização/ condição	H_E	H_O	Autor	Objetivo
<i>T. speciosum</i> Willd.	Malvaceae	Amazônia	0.96	0.19	Da Silva et al. (2017)	Caracterização da diversidade e estrutura genética de pop. naturais de <i>T. speciosum</i> e <i>T. subincanum</i>
<i>T. speciosum</i> Willd.	Malvaceae	Amazônia	0.97	0.25	Varella et al. (2016)	Caracterização da diversidade genética em três fragmentos urbanos
<i>T. speciosum</i> Willd.	Malvaceae	Amazônia	0.88	0.28	Dardengo et al. (2016)	Acessar a diversidade genética para fins de conservação no Parque Nacional da Jurema
<i>T. speciosum</i> Willd.	Malvaceae	Amazônia	0.87	0.24	Dardengo, Rossi e Varella (2018)	Caracterização da diversidade genética em fragmentos urbanos
<i>T. subincanum</i> Mart.	Malvaceae	Amazônia	0.78	0.67	Lemes et al. (2007)	Uso dos microssatélites de <i>T. cacao</i> em outras espécies do gênero <i>Theobroma</i>
<i>T. subincanum</i> Mart.	Malvaceae	Amazônia	0.95	0.16	Da Silva et al. (2017)	Caraterização da diversidade e estrutura genética de pop. naturais de <i>T. speciosum</i> e <i>T. subincanum</i>

3. ESTRUTURA GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO POTENCIAL DE *CARYOCAR VILLOSUM* EM DIFERENTES LOCALIDADES DA AMAZÔNIA

Resumo

O piquiá (*Caryocar villosum*) é exclusivamente neotropical, sendo amplamente distribuído pela Amazônia. Possui ampla utilização por populações tradicionais na alimentação e medicina. Apesar de sua importância, a diversidade e distribuição da espécie ainda foram pouco estudadas. Neste estudo foram coletadas duas populações de piquiazeiros originárias dos Estados de Rondônia e Pará, analisadas com sete marcadores microssatélites, com o objetivo de avaliar a diversidade e estrutura genética dessas populações. Com os dados das coletas e dados obtidos junto a herbários, e utilizando variáveis bioclimáticas, foi também realizada a modelagem de nicho ecológico (MNE), para determinar a distribuição potencial da espécie. No total foram genotipados 130 piquiazeiros, sendo 92 do Pará, e 38 de Rondônia. O Pará apresentou valores superiores para número médio de alelos/loco, número efetivo de alelos, número de alelos privados, riqueza alélica e heterozigosidade esperada. No entanto, apresentou menor heterozigosidade observada. A maior diversidade genética observada no Pará pode estar indicando um possível centro de origem da espécie, que apresenta sistema reprodutivo misto com predominância de alogamia. A estrutura genética espacial foi significativa em ambas as localidades, o que sugere correlações de parentesco entre os indivíduos, provavelmente devido ao comportamento forrageiro de seus polinizadores e dispersores. A estruturação genética entre as duas populações foi observada em todos os métodos, como análises Bayesianas, PCoA e o dendrograma, separando as populações em dois grupos. Com a DAPC foi possível notar as diferenças internas das populações, o que condiz com a AMOVA, que mostrou que a maior parte da variação (89 %) ocorre dentro das populações. Já a diferenciação entre as populações (11 %) pode ser explicada por fatores históricos e pelo elevado fluxo gênico ($Nm = 2,043$). A MNE mostrou que as variáveis de maior contribuição para a distribuição da espécie foram a precipitação anual e a temperatura sazonal. A região em que o piquiazeiro melhor se adequa apresenta climas quentes, com médias superiores a 18 °C todos os meses, e úmido, apresentando entre 1 a 3 meses de seca.

Palavras-chave: Piquiá; Diversidade genética; Estrutura genética espacial; Modelagem de nicho ecológico; Microssatélites

Abstract

The piquiá (*Caryocar villosum*) is exclusively neotropical, being vastly distributed in the Amazon. It is widely used by traditional populations, as food and medicine. Despite of its importance, the diversity and distribution of the species has not yet been well studied. In this study, two populations of piquiás originated in the States of Rondônia and Pará were collected and analyzed using seven microsatellite markers, aiming to evaluate the genetic diversity and genetic structure of these populations. The ecological niche modeling (ENM) was also made to determine the potential distribution of the species, using data from plant collections and herbarium, and bioclimatic variables. In total, 130 piquiás were genotyped, with 92 from Pará and 38 from Rondônia. Pará presented higher values for mean number of alleles/locus, effective number of alleles, number of private alleles, allele richness and expected heterozygosity. However, it showed lower observed heterozygosity. The higher genetic diversity found in Pará may be indicating a possible center of origin of the species, which presents a predominantly outcrossing mixed mating system. The spatial genetic structure was significant in both localities, suggesting kinship correlations among the individuals, probably due to the forage behavior of its pollinators and dispersers. Genetic structure was observed between the two populations in all methods, such as Bayesian analyzes, PCoA and dendrogram, separating the populations into two groups. With the DAPC it was possible to observe the internal differences of the populations, agreeing with AMOVA, which showed that most of the variation (89%) occurs within the populations. On the other hand, the differentiation between the populations (11%) can be explained by historical factors and the high gene flow ($Nm = 2,043$). The ENM showed that the variables with greatest contribution for the species distribution are annual precipitation and seasonal temperature. The most suitable region for piquiá presents warm climates, with averages above 18° C every month, and humid, presenting between 1 and 3 months of drought.

Keywords: Piquiá; Genetic diversity; Spatial genetic structure; Ecological niche modeling; Microsatellites

3.1. Introdução

O piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.) pertence à família Caryocaraceae, sendo exclusivamente neotropical (PRANCE; DA SILVA, 1973). A planta é da ordem Theales, composta por 25 espécies agrupadas em dois gêneros: *Caryocar* e *Anthodiscus*. As folhas são trifoliadas, com a folha central mais longa e as duas laterais relativamente menores (CLAY; CLEMENT, 1993). As inflorescências da *C. villosum* possuem coloração amarelada, pedúnculo longo e pouco flexível, com flores acima da folhagem, que abrem durante a noite e apresentam odor pouco agradável. Seus dispersores de pólen são beija-flores, da espécie *Heliothryx aurita*, abelhas (Apidae), besouros (Lampiridae) e mariposas (Noctuidae). Após o crepúsculo, os besouros e mariposas continuam a visitar as flores, porém as atividades de polinização são intensas com morcegos Glossophaginae e *Phyllostomus discolor* (MARTINS; GRIBEL, 2007).

A espécie é considerada emergente de dossel, podendo atingir alturas de 40-50 m. Quando ocorre em área aberta, as árvores são mais baixas, com galhos abundantes e com copa larga (PRANCE; DA SILVA, 1973). Segundo Collevatti et al. (2009a), *C. villosum* apresenta baixa densidade e é amplamente distribuída pela Amazônia. Sabe-se que o piquiá possui relações antigas com atividades humanas. Um exemplo disso é a Gruta do Piquiá, que existe no estado do Pará, onde já foram encontrados vestígios ósseos, sementes de piquiá e artefatos que remetem a nove mil anos. Também apresenta grande valor alimentar e medicinal para populações humanas e fauna silvestre da Amazônia atual (MORAES, 2011; ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016), e pode possuir valor comercial como fonte de renda alternativa para populações tradicionais (ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016) visto o aumento do preço do fruto de R\$ 0,15 em 1998 a R\$ 2,00 em 2011 (PINTO et al., 2011). Além do fruto, pode ser obtido o óleo de amêndoa com uso potencial para indústria de cosméticos e da casca do fruto é possível a extração de taninos para preparação de tintas (SHANLEY; MEDINA, 2005).

Apesar da sua importância histórica, do constante uso por populações tradicionais e do potencial comercial, a diversidade e distribuição do piquiá ainda foram pouco estudadas. Análises comparativas de genoma nuclear podem prover uma poderosa ferramenta para explicar a diversidade, distribuição e estrutura genética das espécies (COLLEVATTI et al., 2009b). O polimorfismo de DNA baseado em repetições de sequências simples (Simple Sequence Repeats – SSR) ou microssatélites, é considerado um dos marcadores moleculares mais importantes para estimar parâmetros genéticos populacionais e entender padrões de dispersão de pólen e parentesco, pois são altamente informativos devido a sua codominância e

por apresentarem multialelos e alta heterozigosidade (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999). Tomar boas decisões quanto a amostragem populacional pode preservar níveis máximos de diversidade genética e, por isso, é de grande importância saber a distribuição dessa variação pelo território (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Apenas um estudo sobre diversidade genética de *C. villosum* foi realizado até o momento, em que foram analisados acessos presentes em ambas as margens lados do Rio Negro. Foi observado que o rio não servia como barreira geográfica para diferenciação das populações, devido ao grande fluxo gênico, tendo como principal causa a polinização realizada por morcegos do gênero *Phyllostamus* (COLLEVATTI et al., 2009b). A espécie *Caryocar brasiliense* (pequi), próxima ao piquiá (*C. villosum*), entretanto, já foi melhor estudada utilizando marcadores microssatélites (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999; 2001a,b). O estudo sobre o efeito da fragmentação do cerrado na diversidade genética de populações do pequi mostrou que esse processo ainda não afetou a espécie, por ela possuir ciclo de vida longo (COLLEVATTI et al., 2001a). A polinização realizada por morcegos (*Phyllostamus*) e a dispersão de sementes por *Caluromys* spp., que são comuns a ambas as espécies *C. villosum* e *C. brasiliense*, também tiveram seu comportamento estudados com o auxílio de microssatélites (COLLEVATTI et al., 2001b). Os autores observaram que o comportamento forrageiro das duas espécies tem restringido o fluxo gênico e causado o aparecimento de *demes*. Em 2010 esse estudo foi concluído, definindo-se as distâncias máximas e médias de dispersão de sementes como sendo 500 e 132 m, respectivamente, para *C. brasiliense* (COLLEVATTI et al., 2010a). Em 2011, foi visto que há probabilidade de pequizeiros serem parentes em distâncias de até 13 m, sendo que esse valor pode aumentar para indivíduos em estágio adulto, devido à competição por recursos nos estágios de desenvolvimento anteriores (COLLEVATTI; HAY, 2011). Com relação ao sistema reprodutivo, foi observado que o pequi apresenta um sistema misto de cruzamento, com presença de autopolinizações, porém, com fecundação cruzada predominante (COLLEVATTI et al., 2009a, 2010b). Análises com microssatélites mostraram que pequizeiros encontrados no noroeste do bioma Cerrado, no limite sudeste da Floresta Amazônica, onde a distribuição geográfica de *C. villosum* coincide com *C. brasiliense*, hibridizam com os piquizeiros. Acredita-se que isso ocorra porque as flores das duas espécies são indistinguíveis e polinizadas pelas mesmas espécies de morcego (COLLEVATTI et al., 2003), mostrando como as duas espécies são filogeneticamente próximas.

A distribuição de espécies pode ser prevista pela Modelagem de Nicho Ecológico (MNE), com o uso de variáveis bioclimáticas derivadas de temperaturas e chuvas mensais

(PULLIAM, 2000). Em geral, as variáveis são coletadas ou interpoladas de estações climáticas para um grande modelo espacial (FEILHAUER; HE; ROCCHINI, 2012), que irá representar tendências anuais (ex: temperatura média anual, precipitação anual), sazonalidade (por exemplo, intervalo anual de temperatura e precipitação) e fatores ambientais extremos ou limitantes (por exemplo, temperatura do mês mais frio e mais quente, e precipitação dos trimestres húmidos e secos). Assim, a modelagem pode indicar locais de melhor probabilidade para ocorrência da espécie e uso de marcadores permite amostrar a diversidade genética.

O esforço de estudar e amostrar o piquiá se dá pela sua importância como espécie nativa manejada pelo homem na época pré-Colombiana, por ser parte da complementação de renda familiar, além de possuir crescente potencial em diferentes áreas comerciais. Nesse estudo, foram amostrados 130 indivíduos de piquiá encontrados em duas populações na Amazônia Brasileira localizadas no Pará e Rondônia, para responder as seguintes questões: 1) quais são os níveis de diversidade genética entre as populações, 2) quais são as relações genéticas entre essas populações, e 3) qual a distribuição geográfica potencial da espécie e a melhor maneira de amostrá-la para estudos futuros? Os itens 1 e 2 serão respondidos com o emprego de sete locos SSR e análises genéticas. Já o item 3 será respondido com o emprego da MNE, com o uso variáveis bioclimáticas derivadas de temperaturas e precipitações mensais, considerando os indivíduos de coletas atuais e dados de herbários em bancos de dados online.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Localização e caracterização das áreas de estudo

As coletas foram realizadas em comunidades da Reserva Extrativista (RESEX) Rio Ouro Preto, localizada no extremo oeste do estado de Rondônia, nos municípios de Guajará-Mirim e Nova Mamoré, nas comunidades Floresta e Rio Negro, e em duas comunidades ribeirinhas, Maguarí e Jamaraquá, da Floresta Nacional (FLONA) do Tapajós, no Pará. O clima da RESEX Rio Ouro Preto é quente e úmido, com temperatura média anual de 25 °C, máxima de 32 °C e mínima de 21 °C, com concentração de chuvas entre novembro e maio (DE CAMPOS et al., 2014). A FLONA do Tapajós apresenta clima tropical úmido no sistema de Köppen, com variação térmica anual inferior a 5 °C, com média anual de 25,5 °C, máxima

de 30,6 °C e mínima de 21,0 °C (IBAMA, 2004), e as precipitações são concentradas entre os meses de janeiro e maio (RADAMBRASIL, 1976).

A maior parte da RESEX é coberta pela Floresta Ombrófila Aberta Aluvial, com solos hidromórficos, rasos e mal-drenados onde são comuns espécies arbóreas com raízes tabulares e tolerantes a inundações, como a *Virola surinamensis*, *V. crebinervia* e *Iriarteia ventricosa*. A reserva também tem grande parte do seu território coberto pela Floresta Ombrófila Aberta de Terras Baixas, com latossolos ou solos lateríticos, medianamente profundos e bem drenados, onde é comum as espécies arbóreas cedrorana (*Cedrelinga catanaeformis*), mogno (*Swietenia macrophylla*) e cerejeira (*Torresia acreana*). Outros tipos de florestas que existem na reserva são a Floresta Ombrófila Densa Aluvial, Formação Pioneira sob Influência Fluvial Arbórea, Formação Pioneira sob Influência Arbustiva e/ou Arbórea, Formação Pioneira sob Influência Fluvial Arbustiva, Formação Pioneira sob Influência Fluvial Herbácea e/ou Graminóide, Savana Florestada, Savana Arborizada e Campina de Areia Branca. As seis espécies arbóreas mais comuns da reserva são *Protium* spp., *Bertholletia excelsa*, *Copaifera* spp., *Comarouma odorata*, *Eschweilera odorata*, e *Caryocar* spp. (DE CAMPOS et al., 2014).

A vegetação característica da FLONA do Tapajós é predominantemente Floresta Tropical Densa, com cerca de 86 % da área total, com dossel uniforme e, ocasionalmente, árvores emergentes, como é o caso do *C. villosum* (IBAMA, 2004). De acordo com os aspectos fisionômicos, somados as categorias utilizadas pelo Projeto Radambrasil, foi gerado um mapa indicando a presença de três tipos de vegetação: Floresta Tropical Densa, Floresta Tropical Aberta e Floresta Alterada. Foram feitos pelo menos cinco levantamentos florísticos na FLONA até o momento. Em seu plano de manejo ocorre a compilação desses cinco estudos que encontraram 412 espécies, pertencentes a 67 famílias. Para a família Caryocaraceae foram notificados a presença de *C. villosum* e *C. glabrum*, esta última conhecida como piquiarana (IBAMA, 2004).

3.2.2. Amostragem

A amostragem na FLONA do Tapajós ocorreu entre janeiro e fevereiro de 2015 nas comunidades de Maguarí e Jamaraguá, onde foram realizadas turnês guiadas com moradores, percorrendo cerca de 80 km, para identificação dos piquiazeiros. Dos indivíduos encontrados na FLONA foram genotipados 92 indivíduos, os quais apresentam ampla distribuição na região norte da FLONA (Figura 13).

A coleta na RESEX Rio Ouro Preto ocorreu entre novembro e dezembro de 2017, nas comunidades Floresta e Rio Negro, sendo que nessa região também foram realizadas turnês guiadas com moradores locais. A distribuição dos piquiazeiros se mostrou mais dispersa do que a encontrada em Tapajós, totalizando 38 indivíduos, os quais foram utilizados nesse estudo. As árvores das duas localidades foram georreferenciadas, tiveram o DAP mensurado e a caracterização do local pelo morador (Figura 13).

A densidade de piquiazeiros na RESEX Rio Ouro Preto foi calculada de acordo com Alves et al. (2016), em que, considerou-se o comprimento da trilha, desde o primeiro indivíduo de piquiá até o último encontrado ao longo da trilha, multiplicado pelo intervalo estimado de visão na floresta, determinado em 35 metros em cada lado de trilha: (comprimento da trilha X 70 metros) / um hectare.

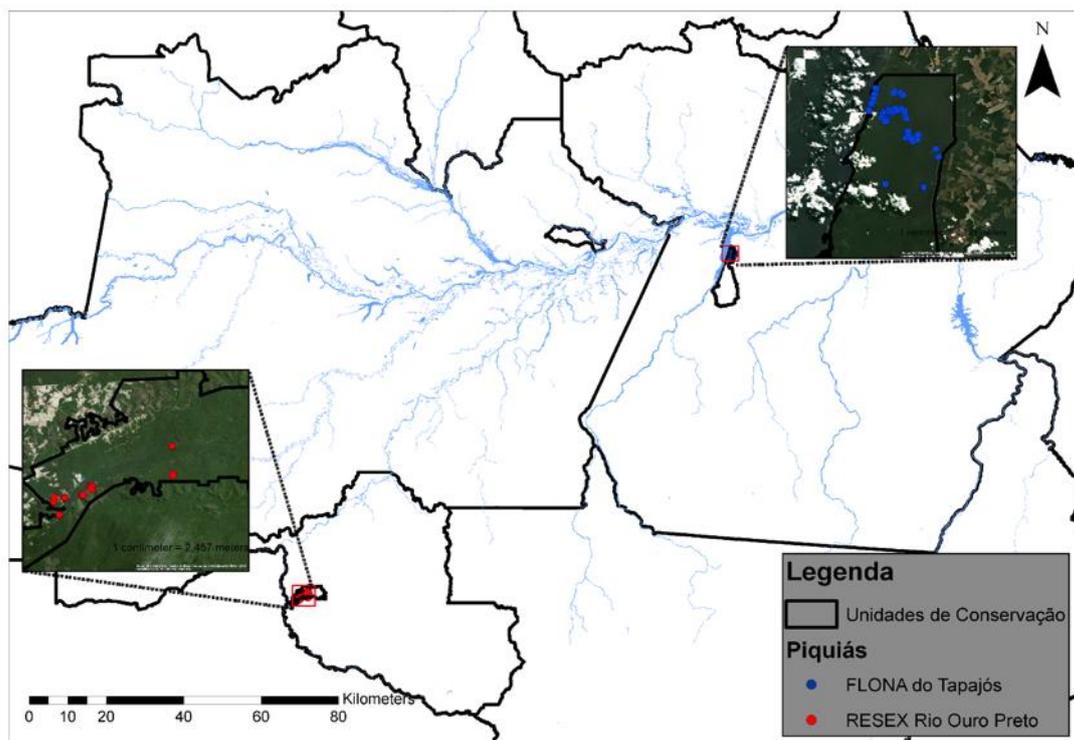


Figura 13. Localização dos piquiazeiros coletados e genotipados na RESEX Rio Ouro Preto (vermelho) e na FLONA do Tapajós (azul).

3.2.3. Extração e genotipagem do DNA

As extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Genética Ecológica de Plantas do Departamento de Genética, na ESALQ/USP, Piracicaba, SP. O DNA foi extraído das folhas por meio do procedimento de CTAB 2 % (Brometo de Cetiltrimetilamônio) (DOYLE; DOYLE, 1987) com alterações, que foram listadas no capítulo 2 dessa dissertação

A quantificação do DNA foi estimada pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante *Gel Red* sob UV em géis de agarose a 0,8 %. Essa intensidade foi comparada a de padrões com pesos moleculares e concentrações específicas e conhecidas de DNA do fago λ (10 e 50 ng). A eletroforese foi realizada em cuba contendo tampão TBE 1 %.

Dez loci de microssatélites previamente desenvolvidos para *C. brasiliense* (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999) foram avaliados, sendo que sete mostraram boa resolução e polimorfismo para *C. villosum* e foram utilizados para genotipar as amostras. Os *primers* no sentido *forward* foram marcados com coloração fluorescente e anexados ao final 5' da sequência do *primer* universal M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3').

O termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, US) foi utilizado para realizar ampliações por PCR, tendo sido incluídos 0,5 mM de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria), 200 mM de cada dNTP, 1X tampão (10 mM Tris-HCL pH 8,3 com 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) (COLLEVATTI et al., 2009b), e 2,4 mM de MgCl₂. A PCR foi realizada de acordo com Schuelke (2000) em um processo de dois passos: o primeiro passo consistiu na desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C ou 54 °C por 1 min (de acordo com cada *primer*-temperatura de anelamento) e 72 °C por 1 min. A segunda parte foi composta por oito ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 45 s e 72 °C por 45 s, com uma extensão final de 72 °C por 1 hora. A qualidade e o tamanho dos produtos de amplificação foram visualizados e comparados com marcador - *Ladder* 1 kb Plus (Invitrogen) - em gel de agarose a 1,5 % submetidos a eletroforese por 90 minutos a 80 V.

A genotipagem foi feita utilizando eletroforese capilar e por sistema multiplex. Nesse sistema, as ampliações de cada loco obtidas em PCRs individuais são unidas em uma nova placa, de acordo com o tamanho do loco e com a fluorescência em que ele foi marcado. A genotipagem foi realizada em analisador automático de DNA ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) pelo Setor de Sequenciamento de DNA do Instituto de Biociências – USP, sendo determinados os tamanhos dos alelos com o auxílio de marcador com tamanhos

de fragmentos conhecidos, o ,*GeneScan™–500 ROX® Size Standard* (Applied Biosystems, Foster City, USA). A detecção dos picos de fluorescência foi realizada com o software GeneMapper 4.1 (*Applied Biosystems*). A partir da detecção dos tamanhos dos fragmentos amplificados com cada par de *primers* para cada indivíduo, foi gerada uma planilha utilizada para as análises estatísticas e genéticas.

3.2.4. Análise estatística dos dados

3.2.4.1. Diversidade genética e estrutura genética espacial

A diversidade genética de cada população foi caracterizada utilizando o número médio de alelos por loco (N_a), a porcentagem de locos polimórficos, a riqueza alélica (A_r), a frequência alélica, as heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e), e o índice de fixação (f) de Wright. A riqueza alélica (A_r) foi calculada utilizando o pacote PopGenReport (GRUBER; ADAMACK, 2017) e os demais parâmetros foram calculados baseados em 1000 replicações bootstrap, obtidas com o pacote diveRsity (KEENAN et al., 2013) do plataforma R 3.4.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017). O índice de fixação (f) de Wright descreve a distribuição da variação genética por meio de coeficientes de endogamia, que equivalem à redução na heterozigosidade esperada com cruzamentos ao acaso em qualquer nível hierárquico populacional com relação a outro nível mais inclusivo (HARTL; CLARK, 2010). Foi calculado o F_{ST} das estatísticas F de Wright com *GenAlex* v. 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012), para determinar a divergência entre as populações. Foram também calculados o número de alelos efetivos (N_e) e o número de alelos privados (N_p) utilizando o software *GenAlex* v. 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A taxa de cruzamento aparente (\hat{t}_a) foi estimada considerando o índice de fixação (f) para cada local (VENCOVSKY, 1994) de tal forma que $\hat{t}_a = (1-f)/(1+f)$.

A estrutura genética espacial (EGE) para cada população foi analisada baseada no coeficiente de parentesco ou coancestria (F_{ij}) entre os pares de indivíduos como apresentado em Loiselle et al. (1995). Para visualizar a estrutura genética espacial, os valores de F_{ij} foram plotados contra classes de distâncias com o mesmo número de pares de indivíduos. Para cada intervalo de distância e coeficiente de parentesco foram feitas 20.000 permutações de Monte Carlo, com intervalo de confiança de 95 %. A extensão total da EGE em cada população foi

quantificada utilizando a estatística S_p , que é dependente da diminuição do coeficiente de coancestria entre pares de indivíduos, e do logaritmo de distância em duas dimensões. Assim, a estatística é calculada como S_p : $S_p = b - \log(F_I - 1)$, onde F_I é a média do coeficiente de coancestria entre todos os pares de indivíduos da primeira classe de distância (VEKEMANS; HARDY, 2004) e $b - \log$ é a curva de regressão do coeficiente de coancestria utilizando o logaritmo de distância espacial $\ln(d_{xy})$. Essas análises foram realizadas no software SPAGeDi v. 1.5 (HARDY; OLIVER J; VEKEMANS, 2002).

3.2.4.2. Estrutura genética populacional

Foram realizadas análises Bayesianas com o software *Structure* v.2.3.4. (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) para determinar a estrutura genética entre os piquiazeiros das duas regiões. Foram feitas 10 simulações para cada K número de agrupamentos, em que K variou de 1 a 10, considerando o modelo de frequências alélicas correlacionadas e o modelo *admixture* de ancestralidade. A cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) teve 500.000 iterações após um período inicial de *burnin* de 200.000 iterações. O aplicativo on-line *Structure Harvester* (EARL; VONHOLDT, 2012) foi utilizado para determinar o K mais provável de agrupamentos baseado no ΔK do método de Evanno et al. (2005). Com o programa *Clumpp* v. 1.1.2b (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) foi feita a sumarização dos resultados das 10 simulações realizadas para o número K de agrupamentos mais prováveis. A representação em gráficos de barra dos resultados obtidos foi feita no Microsoft Excel.

Como forma de avaliar a estrutura genética com maior profundidade e devido ao fato de que as análises Bayesianas feitas com o *Structure* possuem fortes pressupostos genéticos, como aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e minimização do desequilíbrio de ligação, foram realizadas Análises Discriminantes de Componentes Principais (DAPC) (JOMBART et al., 2010) com o pacote da plataforma R 3.4.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017) *Adegenet* v.1.3.1 (JOMBART; AHMED, 2011). A primeira DAPC (DAPC 1) utilizou o método *K-means*, em que ocorrem sucessivas corridas para aumentar o número de agrupamentos (K) e depois transformar os dados usando a PCA. Para cada modelo é calculada uma medida estatística de adequação (*Bayesian Information Criterion*, BIC) para escolher o melhor o K (JOMBART et al., 2010). Após isso, é definido o melhor número de PCAs retidas por meio da função *α -score* e, assim, gerados os gráficos *scatter* e *compoplot*. O outro método aplicado, DAPC2, considerou a existência das duas localidades para a formação dos grupos e

utilizou o α -score para a melhor retenção de PCAs e para gerar os gráficos. As probabilidades de adesão de um indivíduo em diferentes grupos são semelhantes aos resultados de atribuição obtidos no *Structure* e por isso podem ser comparadas.

Utilizando a distância proposta por Nei (1972), foi construído um dendrograma com o método UPGMA para representar as relações entre os indivíduos e as localidades, com o pacote *poppr* (KAMVAR; TABIMA; GRÜNWALD, 2014) do plataforma R (R Development Core Team, 2015), e intervalos de confiança baseados em 1000 replicações bootstrap. O dendrograma foi formatado no *FigTree 1.4.1* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

A dispersão da diversidade genética entre as localidades foi avaliada por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e a distribuição hierárquica da variação genética dentro e entre locais foi avaliada utilizando a Análise de Variância Molecular (AMOVA) “Locus-by-locus”, sendo o programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) utilizado para ambas as análises. A AMOVA foi conduzida com 10.000 permutações. O fluxo gênico (Nm) foi calculado a partir do F_{ST} em que $Nm = 1/4(1/F_{ST}-1)$ (WRIGHT, 1951). Adicionalmente, foi verificado se existe correlação entre as distâncias genéticas de Cavalli-Sforza e Edwards e as distâncias geográficas (km) das populações, com o teste de Mantel (1967), utilizando o pacote *Adegenet* (JOMBART; AHMED, 2011) do plataforma R (R Development Core Team, 2015). A significância foi acessada utilizando 10.000 permutações.

3.2.4.3. Potencial distribuição do *Caryocar villosum*

O total de 150 pontos de ocorrência da espécie foram utilizados, somando 40 pontos das coletas no Pará e em Rondônia e 110 dados georreferenciados do projeto speciesLink (<http://splink.cria.org.br>) e do portal Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Todas as coordenadas foram manualmente verificadas e dados imprecisos foram descartados. Para eliminar a autocorrelação espacial entre as ocorrências, principalmente entre os pontos de coleta, foi aplicada uma rarefação simples ao conjunto total de dados, utilizando o SDM Toolbox (BROWN, 2014), no *software* ArcGis 10.5. Modelos para as quatro distâncias de rarefação foram gerados (1 km, 5 km, 10 km e 20 km). O tratamento com melhor desempenho estatístico foi utilizado na modelagem final.

Para cada ocorrência, foram obtidas 19 variáveis bioclimáticas do banco de dados *WORLDCLIM* com resolução de 30”. As 19 variáveis bioclimáticas são Bio1: Temperatura média anual, Bio2: Temperatura média diurna mensal, Bio3: Isotermalidade (Bio2/Bio7) (*100), Bio4: Temperatura sazonal, Bio5: Temperatura máxima do mês mais quente, Bio6: Temperatura mínima do mês mais frio, Bio7: Faixa de temperatura anual (Bio5-Bio6), Bio8:

Temperatura média do trimestre mais úmido, Bio9: Temperatura média do trimestre mais seco, Bio10: Temperatura média do trimestre mais quente, Bio11: Temperatura média do trimestre mais frio, Bio12: Precipitação anual, Bio13: Precipitação do mês mais úmido, Bio14: Precipitação do mês mais seco, Bio15: Precipitação de sazonalidade, Bio16: Precipitação do trimestre mais seco, Bio17: Precipitação do trimestre mais úmido, Bio18: Precipitação no trimestre mais quente e Bio19: Precipitação no trimestre mais frio. Para evitar redundância de informações trazidas por diferentes variáveis, o teste de correlação de Pearson foi realizado. Uma das duas variáveis com índice de correlação igual ou maior que 0,7 era removida do conjunto.

A modelagem de nicho ecológico que irá determinar possíveis distribuições espaciais do *Caryocar villosum* foram gerados utilizando o software *Maxent* v. 3.4.1 (PHILLIPS; DUDÍK, 2008). Foram utilizados como parâmetros: *convergence threshold* de $1e-5$, 500 iterações e 10.000 pontos de *background*. Os modelos foram submetidos a dez repetições, validadas pelo método *bootstrap*. Os dados de ocorrência foram divididos em 70 % utilizados para o treinamento do modelo e 30 % dos restantes para o teste. A acurácia do modelo foi analisada usando a área sob a curva (*Area Under the Curve* - AUC), os valores de omissão e o p-valor para três limiares de corte: limite de corte de 10 % (*10 percentile training presence Cloglog threshold*), limite de corte máximo (*Maximum test sensitivity plus specificity Cloglog threshold*) e limite de corte mínimo (*Minimum training presence Cloglog threshold*). O limiar com os menores valores de omissão e p-valor foi escolhido para o modelo final. A contribuição das variáveis não-correlacionadas utilizadas no modelo final foi testada por meio do método de *jackknife*. Foram geradas curvas de resposta para as duas variáveis que mais contribuíram para o modelo.

3.3. Resultados

3.3.1. Diversidade genética

Foram genotipados 130 piquiazeiros, sendo 92 da FLONA do Tapajós, no Pará, e 38 da RESEX Rio Ouro Preto, em Rondônia. Entre os 130 plantas foram encontrados, em média, 11,8 alelos por loco (N_a), com o polimorfismo variando entre 10 e 16 alelos por loco (Tabela 4). A heterozigosidade esperada (H_E) foi próxima a 80 % para todos os locos, sendo os locos

de maior diversidade o cb20 e cb6. Todos os locos apresentaram desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg a 5 % de probabilidade,. Em média, o índice de fixação foi 0,142. O loco cb3 que apresentou índice de fixação negativo (-0,169), ou seja, que não apresenta endogamia, também é o loco com menor número de alelos nulos

Tabela 4. Diversidade genética presente nos sete locos de microssatélites utilizados com piquiá (*Caryocar villosum*) na região do Pará e Rondônia. A = número de alelos por loco, H_O = heterozigosidade observada, H_E = heterozigosidade esperada, f = índice de Fixação, EHW = equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde ** representa a inexistência de EHW.

Locos	A	H_O	H_E	f	EHW
cb11	10,0	0,732	0,794	0,081	**
cb5	14,0	0,531	0,791	0,324	**
cb20	10,0	0,748	0,826	0,094	**
cb6	12,0	0,654	0,821	0,204	**
cb9	10,0	0,732	0,778	0,045	**
cb3	10,5	0,865	0,761	-0,169	**
cb23	16,0	0,450	0,779	0,413	**
Média	11,8	0,673	0,793	0,142	

Analisando os parâmetros por regiões, o Pará apresentou maior número médio de alelos por loco ($A = 14,57$ vs $9,0$), número de alelos efetivos ($N_e = 6,86$ vs $4,3$), número de alelos privados ($N_p = 6,71$ vs $1,14$), riqueza alélica ($A_r = 11,37$ vs $7,9$) e heterozigosidade esperada ($H_E = 0,840$ vs $0,746$) do que a região de Rondônia. Entretanto, o valor da heterozigosidade observada foi maior em Rondônia ($H_O = 0,708$). O índice de fixação foi menor em Rondônia, na RESEX Rio Ouro Petro ($f = 0,050$ vs $0,241$), o que teria influenciado na maior taxa de cruzamento aparente na região de Rondônia ($\hat{t}_a = 0,905$), em comparação com o Pará ($\hat{t}_a = 0,612$), sendo que a taxa de cruzamento média aparente estimada para a espécie foi $0,758$ (Tabela 5). Rondônia também apresentou o menor número de alelos nulos, somente nos locos cb5, cb6 e cb 23. No Pará, a presença de alelos nulos foi mais ocorrente, sendo que somente o loco cb3 não foi significativo para esse parâmetro.

Tabela 5. Diversidade genética de piquizeiros (*Caryocar villosum*) presente na Flona Tapajós de Pará e na Resex Ouro Preto de Rondônia utilizando sete locos de microssatélites. N = número de alelos, A = número médio de alelos por loco, Ne = número de alelos efetivos, Np = número de alelos privados, H_O = heterozigosidade observada, H_E = heterozigosidade esperada, f = índice de Fixação, Ar = riqueza alélica, \hat{t}_a = taxa de cruzamento aparente.

População	N	A	Ne	Np	H_O	H_E	f	Ar	\hat{t}_a
Pará	102	14,6	6,9	6,7	0,638	0,840	0,241	11,6	0,612
Rondônia	63	9,0	4,3	1,1	0,708	0,746	0,050	8,2	0,905
Média	82,5	11,8	5,6	3,9	0,673	0,793	0,146	9,6	0,758

Em todos os locos analisados, dois ou mais alelos apresentaram porcentagens diferentes entre as regiões (Figura 14). Apesar da maioria dos alelos serem comuns entre Pará e Rondônia, a FLONA do Tapajós, no Pará, apresentou maior número de alelos privados ($Np = 6,714$, Tabela 5), de tal forma que é possível observar que nem todos os alelos presentes no Pará são encontrados em Rondônia (Figura 14).

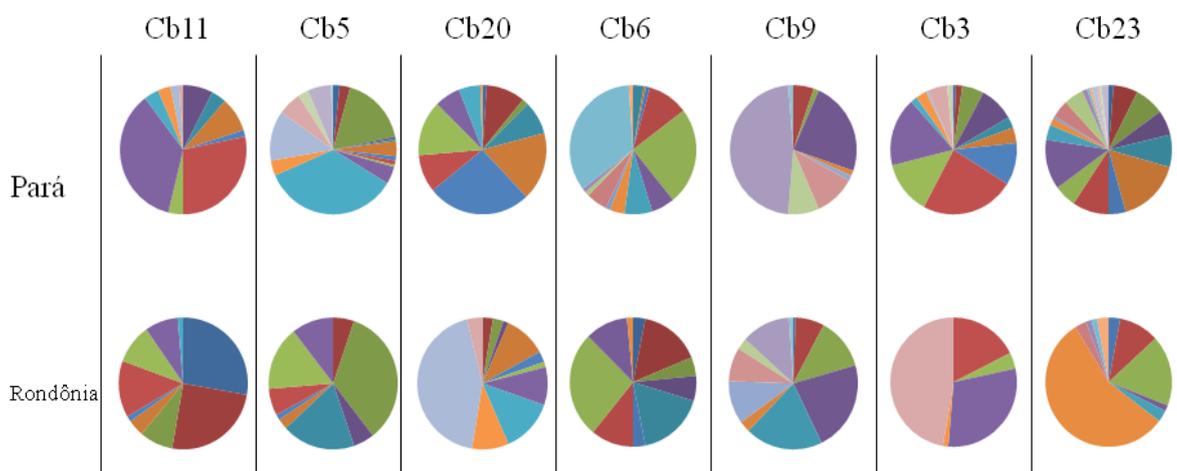


Figura 14. Representação das frequências alélicas dos sete locos microssatélites analisados em 130 indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*) nas regiões do Pará e Rondônia.

3.3.2. Estrutura Genética Espacial

A estrutura genética espacial foi significativa até 10 metros para a FLONA do Tapajós (Figura 15A), no Pará, e até 3 metros na RESEX Rio Ouro Preto (Rondônia) (Figura

15B), o que sugere que os indivíduos amostrados até essas distâncias apresentam correlações de parentesco. Acima desses valores, os F_{ij} não são significativamente diferentes ou menores do que zero. As curvas de regressão $b\text{-log}$ para os coeficientes de parentesco sob os logaritmos das escalas de distâncias espaciais (0-165 m no Pará; 0-45 m em Rondônia) apresentaram valores negativos (-0,071 no Pará; -0,010 em Rondônia), mostrando um padrão de isolamento por distância. As estatísticas Sp foram de 0,0076 e 0,0102, para as regiões do Pará e Rondônia, respectivamente.

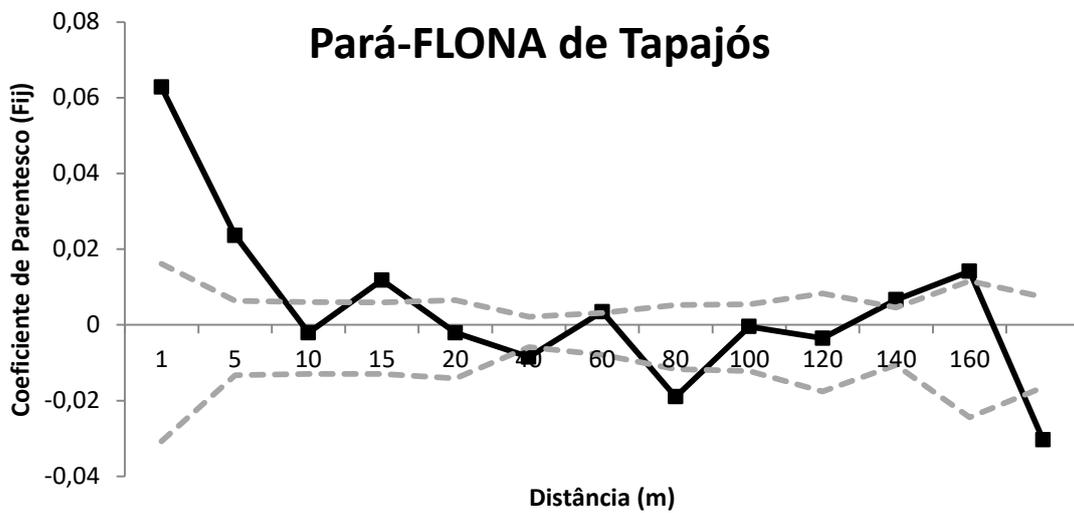
3.3.3. Estrutura Genética

Os 130 piquiás das duas regiões foram agrupados geneticamente por simulações Bayesianas realizadas no programa *Structure*. O número de agrupamentos determinado pelo ΔK do método de Evanno et al. (2005) foi $K=2$ (Figura 16A). De acordo com $K=2$, o grupo 1 é formado por indivíduos da região do Pará e o grupo 2 pelos de Rondônia (Figura 16B).

A projeção das 130 amostras em um plano bidimensional definido por duas coordenadas principais (Figura 17), que explicam 30,9 % da variação total, mostrou uma tendência em agrupar os indivíduos de acordo com sua origem geográfica. Indivíduos de Rondônia encontram-se nos quadrantes da esquerda e os do Pará estão agrupados, predominantemente, nos quadrantes da direita. Entretanto, é possível observar que alguns indivíduos da região do Pará encontram-se nos quadrantes da esquerda, junto aos de Rondônia. Comparando com os resultados do *Structure*, é possível observar a existência de piquiázeiros classificados como pertencentes à região de Rondônia dentro do agrupamento do Pará (Figura 16B).

Os resultados das análises Bayesiana (Figura 16) e PCoA (Figura 17) estão de acordo com os encontrados na análise de agrupamento. O dendrograma (Figura 18) representa a relação entre os indivíduos das duas regiões e a separação entre elas. Em 100 % das 1000 repetições *bootstrap*, a maioria dos indivíduos de Rondônia formou um grupo distinto dos indivíduos do Pará. Essa região apresenta dois grupos principais, os quais possuem subdivisões internas. Um dos grupos é mais amplo, pois engloba tanto indivíduos encontrados na mata quanto os cultivados em quintais da FLONA do Tapajós. O outro grupo presente no Pará possui, majoritariamente, indivíduos da floresta.

A)



B)

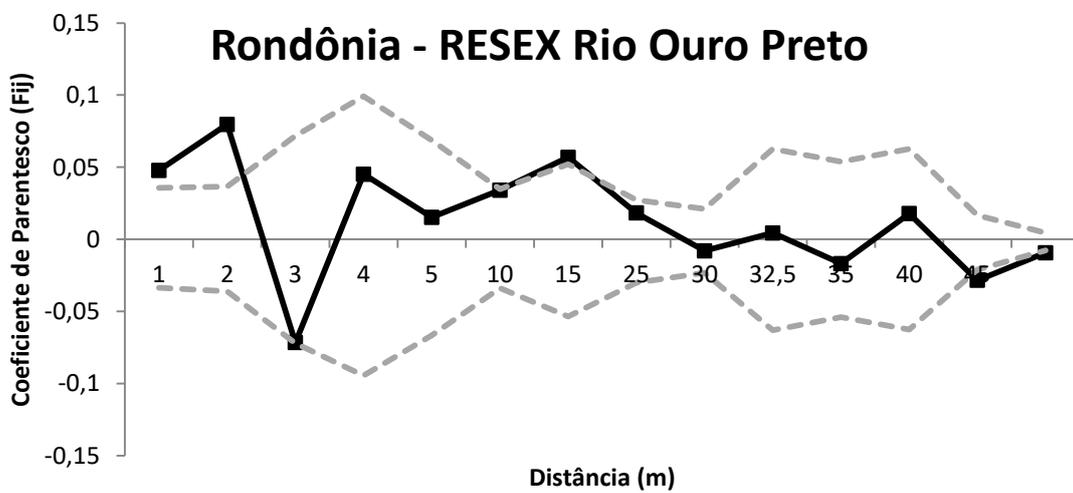
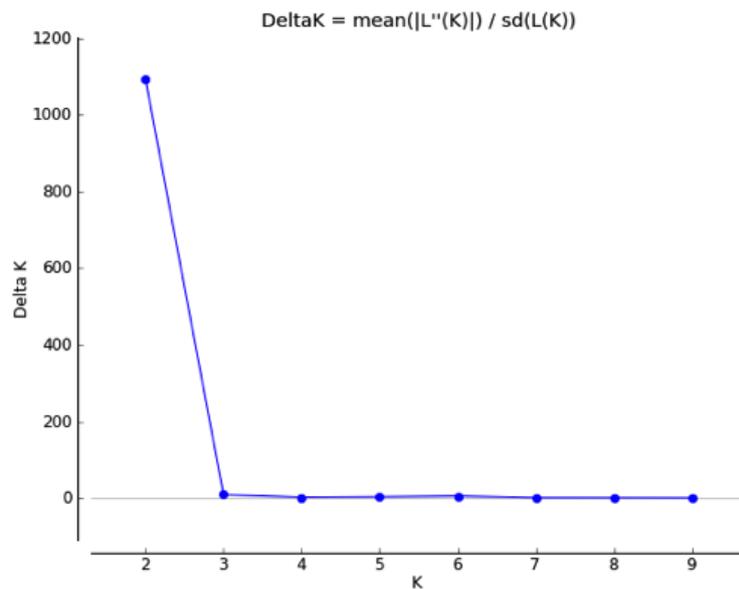


Figura 15. Estrutura genética espacial presente entre indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*) em (A) Pará e (B) Rondônia. As linhas sólidas representam o *Fij* estimado médio e as linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 95% do *Fij* médio calculado com 20.000 permutações.

A)



B)



Figura 16. Estrutura genética encontrada entre piquiazeiros (*Caryocar villosum*) do Pará, na FLONA do Tapajós, e em Rondônia, na RESEX Rio Ouro Preto, com base em sete locos microssatélites. A) Gráfico baseado no ΔK calculado de acordo com Evanno et al. (2005) para estimar o número de grupos nos 130 indivíduos amostrados. B) Distribuição dos 130 indivíduos de *C. villosum* em dois ($K = 2$) grupos usando o método Bayesiano de análise de estrutura de populações com o *Structure* (PRITCHARD et al. 2000). Cada barra sólida representa um indivíduo, e as duas cores correspondem a grupos distintos. Barras com cores misturadas mostram a proporção da variabilidade atribuído a cada grupo.

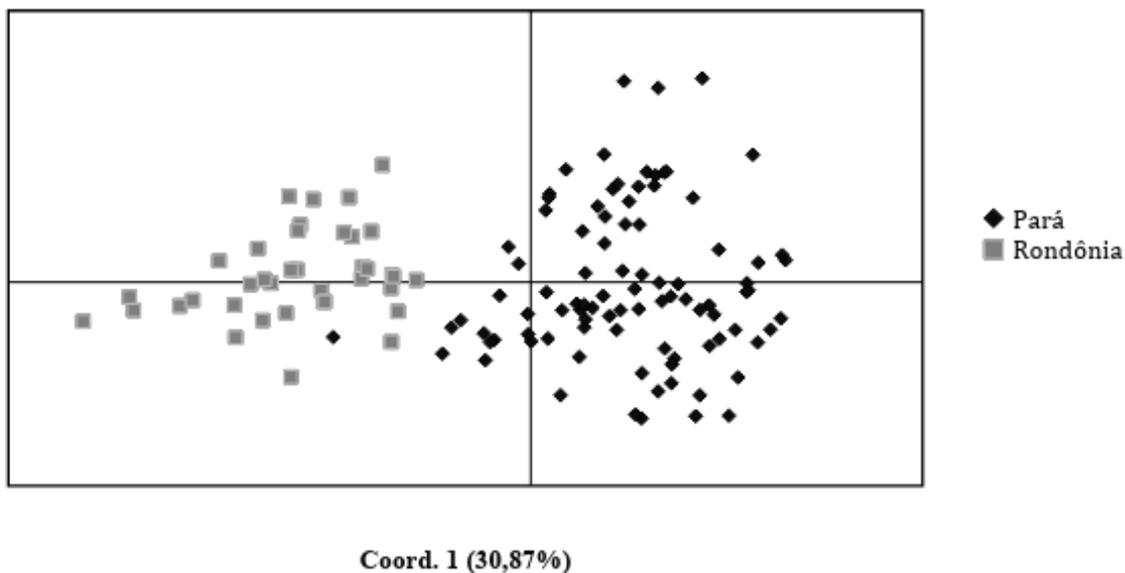


Figura 17. Análise de coordenadas principais (PCoA) para os 130 indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*), baseado em sete locos microssatélites.

Foram também realizadas duas análises discriminantes de componentes principais (DAPCs). A DAPC1, conduzida pelo método *K-means*, mostrou a formação de quatro grupos ($K = 4$). Os dois primeiros componentes principais (PCAs) explicaram 61,17 % da variação total. Desses quatro grupos, três pertencem à região do Pará e um, majoritariamente, representa Rondônia. A separação entre Rondônia e Pará é semelhante à encontrada na análise Bayesiana do *Structure* (Figura 16B). Os três grupos presentes na região do Pará são similares aos encontrados no capítulo anterior dessa dissertação. Os grupos representam os genótipos da maioria dos indivíduos cultivados em quintais, os piquizeiros presentes na mata e os indivíduos com atribuição duvidosa aos grupos, cujo genótipo não é agrupado nem como cultivado e nem como natural da mata. No capítulo anterior foi visto como alguns indivíduos presentes nos quintais se assemelham mais aos de mata do que com outros cultivados e que o mesmo ocorre na mata, devido a ainda baixa estruturação entre árvores de quintais e de mata. A representação gráfica de probabilidade de associação (Figura 19A) mostra que a maior parte da variabilidade encontrada dentro dos grupos está na região do Pará, provavelmente pela existência dos grupos explicados anteriormente, semelhante ao observado no dendrograma (Figura 18).

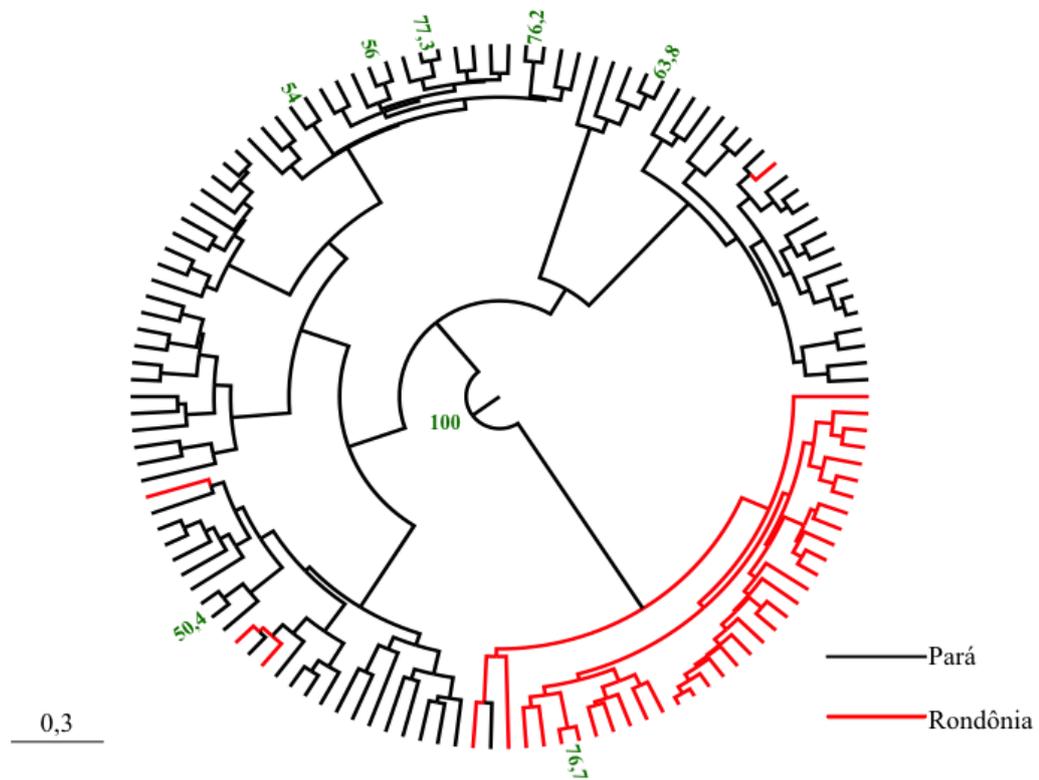
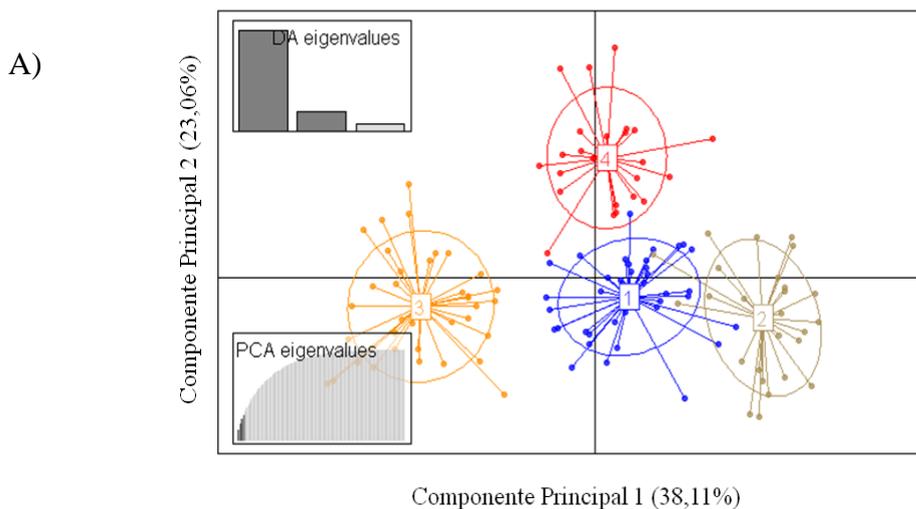


Figura 18. Dendrograma obtido com a distância de Nei (1972) e método UPGMA para os 92 indivíduos de piquiá (*Caryocar villosum*) da FLONA do Tapajós e os 38 indivíduos da RESEX Rio Ouro Preto, Rondônia, baseado nos resultados de sete marcadores microssatélites. Os números em verde representam as repetições *bootstraps* usadas para formar os grupos ou ramos.

A DAPC2 foi feita com os grupos Pará e Rondônia pré-definidos. Esse método mostrou uma maximização da variação entre grupos e diminuição da variação dentro dos grupos e, dessa forma, foi possível visualizar de forma precisa a diferenciação entre as regiões do Pará e Rondônia, resultando em um gráfico de probabilidade de associação (Figura 19B) semelhante ao encontrado com o *Structure* e sem os três diferentes grupos na região do Pará.





B)

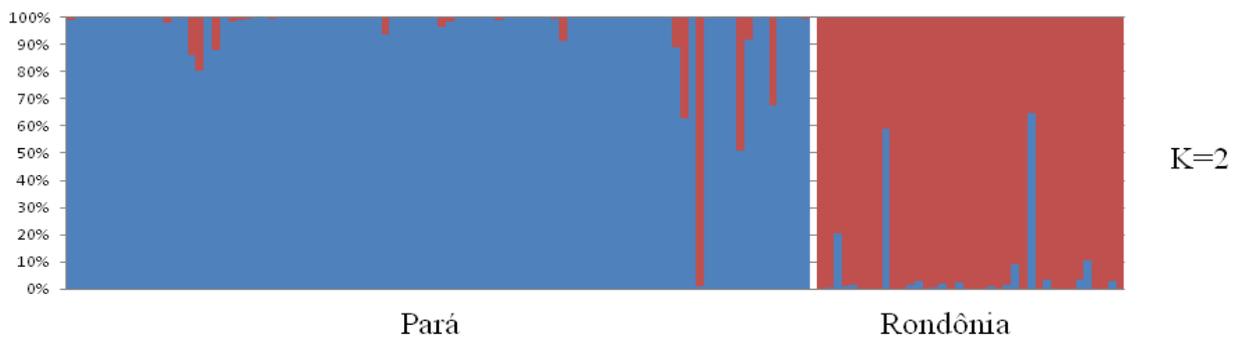
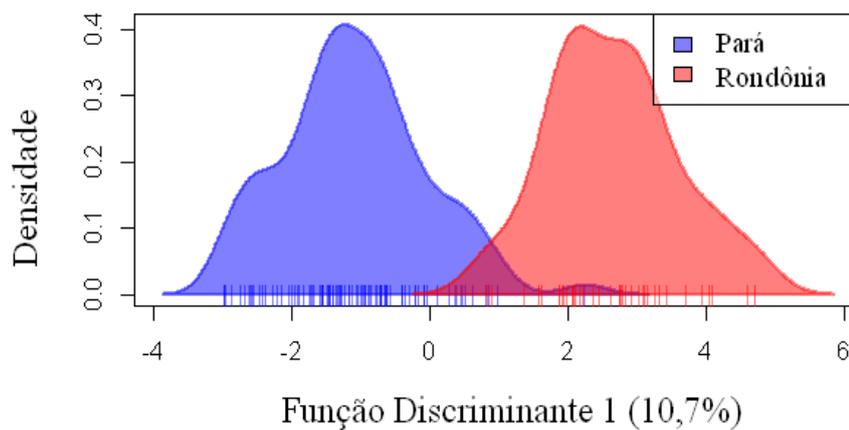


Figura 19. Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) com base em sete locos microsatélites para os 130 indivíduos de piquazeiros (*Caryocar villosum*) coletados na Flona do Tapajós, Pará, e na Resex Rio Ouro Preto, Rondônia. A) Gráficos *scatter* e *compoplot* (probabilidade de associação) feitos utilizando a metodologia 1 (DAPC1), em que foram encontrados $K = 4$ grupos, com três grupos dentro da região do Pará e um grupo predominante em Rondônia. B) Gráficos *scatter* e *compoplot* (probabilidade de associação) baseados na metodologia 2 (DAPC2), com $K = 2$ grupos bem definidos, utilizando as regiões de Pará e Rondônia pré-definidos na análise.

No teste de Mantel, foi encontrada correlação positiva e significativa entre as distâncias genéticas e geográficas ($r = 0,3486$, $p\text{-valor} = 0,0001$). Esses resultados indicam que há uma associação entre as distâncias genéticas e as geográficas, porém que esse não é o fator de maior diferenciação entre as populações, visto que aproximadamente 70 % da variação genética não é explicada pela distância geográfica.

De forma complementar, a análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da variação (89 %) foi encontrada dentro das populações, sendo que aproximadamente 11 % da variação foi encontrada entre populações (Tabela 6). O fluxo gênico analisado entre populações apresentou um alto valor ($Nm = 2,043$), o que explica o intermediário $F_{ST} = 0,109$, observado entre populações (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) baseada em sete locos microssatélites e em 130 indivíduos das populações de piquizeiros (*Caryocar villosum*) de FLONA do Tapajós e RESEX Rio Ouro Preto. F_{ST} indica a diferenciação entre os grupos.

Fonte	Graus de Liberdade	Média de Quadrados	Variância	%	F_{ST}
Entre estados	1,0	41,132	0,356	10,96	0,109 (p-valor = 0,0001)
Dentro das populações	258,0	2,888	2,888	89,04	
Total	259,0		3,244	100,0	

3.3.4. Potencial de distribuição da espécie *Caryocar villosum*

O modelo final para a distribuição de *Caryocar villosum* (Figura 21) foi gerado a partir da rarefação de 1 km e contou com 75 pontos de ocorrência, com $AUC = 0,833$ ($\pm 0,039$). O limiar de corte escolhido foi *cloglog* de presença mínima; dessa forma, a adequabilidade ficou definida como 0,1094, sendo que valores abaixo desse limite foram considerados inadequados para a ocorrência da espécie dentro desse limiar. A porcentagem de omissão desse método resultou em 4,3 % ($p\text{-valor} = 0,0039$).

Considerando este limiar, a área adequada para a ocorrência de *C. villosum* foi de 5.976.460,86 km², o que representa cerca de 65,86 % da área de estudo. Dos 75 pontos de ocorrência considerados na geração do modelo, quatro estavam localizados em áreas não adequadas, o que representa um erro de omissão de 5,6 %. Dos 71 pontos localizados em áreas adequadas, 42,2 % estão em alta adequabilidade ($x \geq 0,75$), 36,6 % em média adequabilidade ($0,75 < x \leq 0,5$) e 21,1 % em áreas de baixa adequabilidade ($0,5 < x \leq 0,109$).

As variáveis de maiores contribuições para a distribuição de *C. villosum* foram a precipitação anual (Bio12) e a temperatura sazonal (Bio4) (Figura 20), que juntas explicam 59,4 % da distribuição da espécie (Tabela 7). As curvas de resposta geradas para essas variáveis mostram que a espécie se adéqua melhor a áreas com precipitações anuais entre 1500 e 3000 mm e com baixa variabilidade de temperatura (Figura 20).

Tabela 7. Porcentagem de contribuição das cinco variáveis ambientais obtidas no WorldClim utilizadas para gerar o modelo de distribuição de *Caryocar villosum*.

Variáveis	Descrição	Contribuição (%)
Bio12	Precipitação Anual	31,1
Bio4	Temperatura Sazonal	28,3
Bio18	Precipitação no trimestre mais quente	15,0
Bio1	Temperatura média anual	14,6
Bio19	Precipitação no trimestre mais frio	11,0

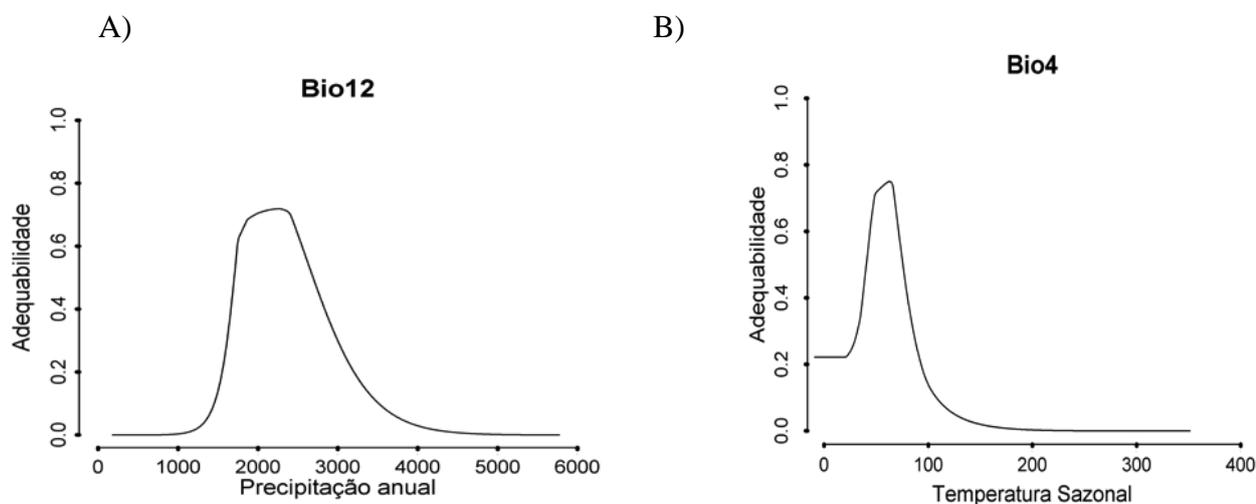


Figura 20. Curvas de resposta de *Caryocar villosum* para as variáveis: (A) precipitação anual em mm (Bio12) e (B) temperatura sazonal (Bio4).

O modelo foi também projetado para toda a América do Sul e Central, com isso, o valor do AUC sofreu uma leve queda ($0,8142 \pm 0,0366$) (Figura 22), o limiar *cloglog* sofreu o dobro de aumento (0,209) e o erro de omissão passou a ser 1,9 %, também significativo e com p-valor = 0,0001.

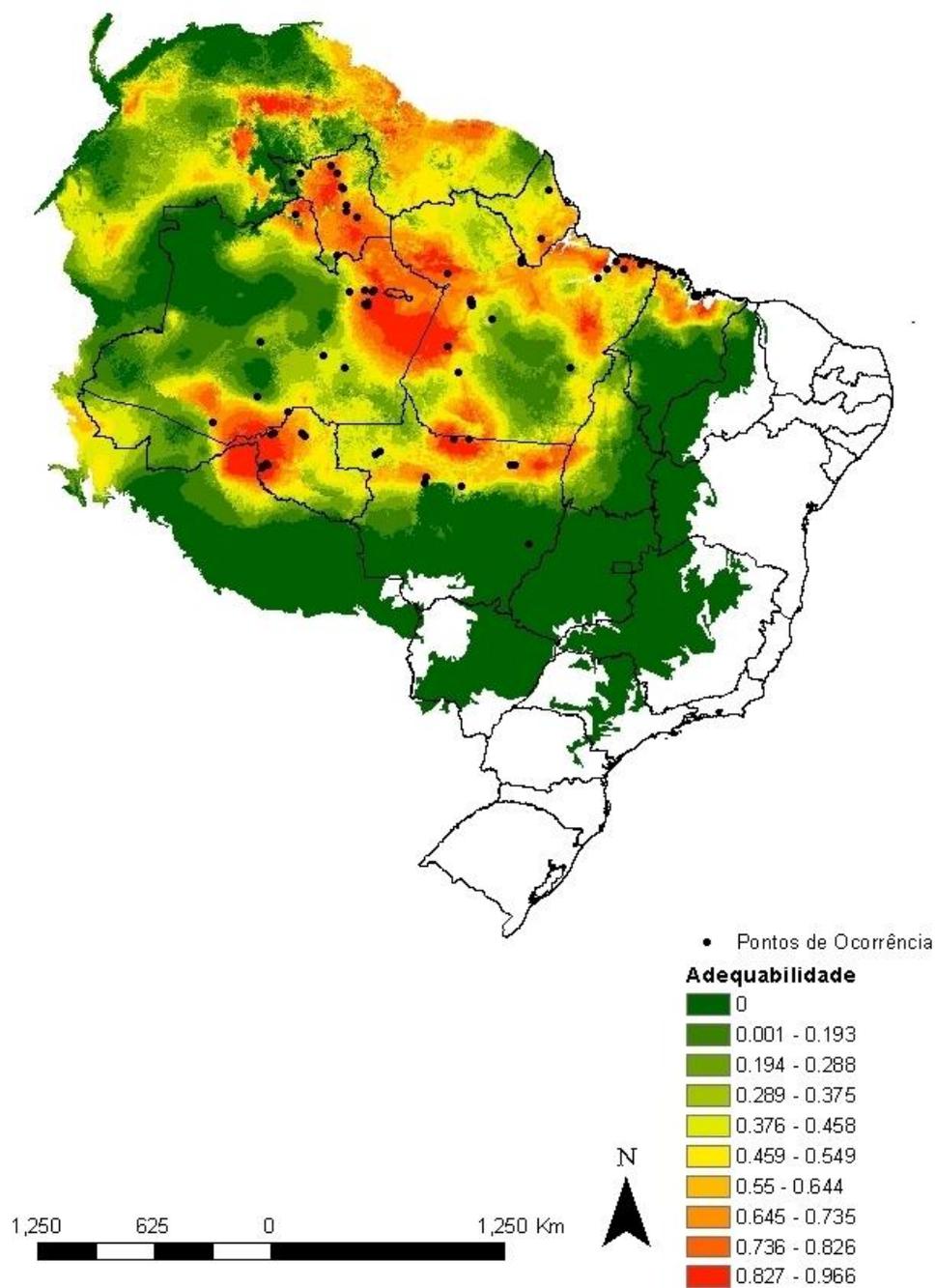


Figura 21. Modelagem de nicho ecológico de *Caryocar villosum*, mostrando a adequabilidade para a ocorrência da espécie e os pontos de ocorrência utilizados para gerar o modelo.

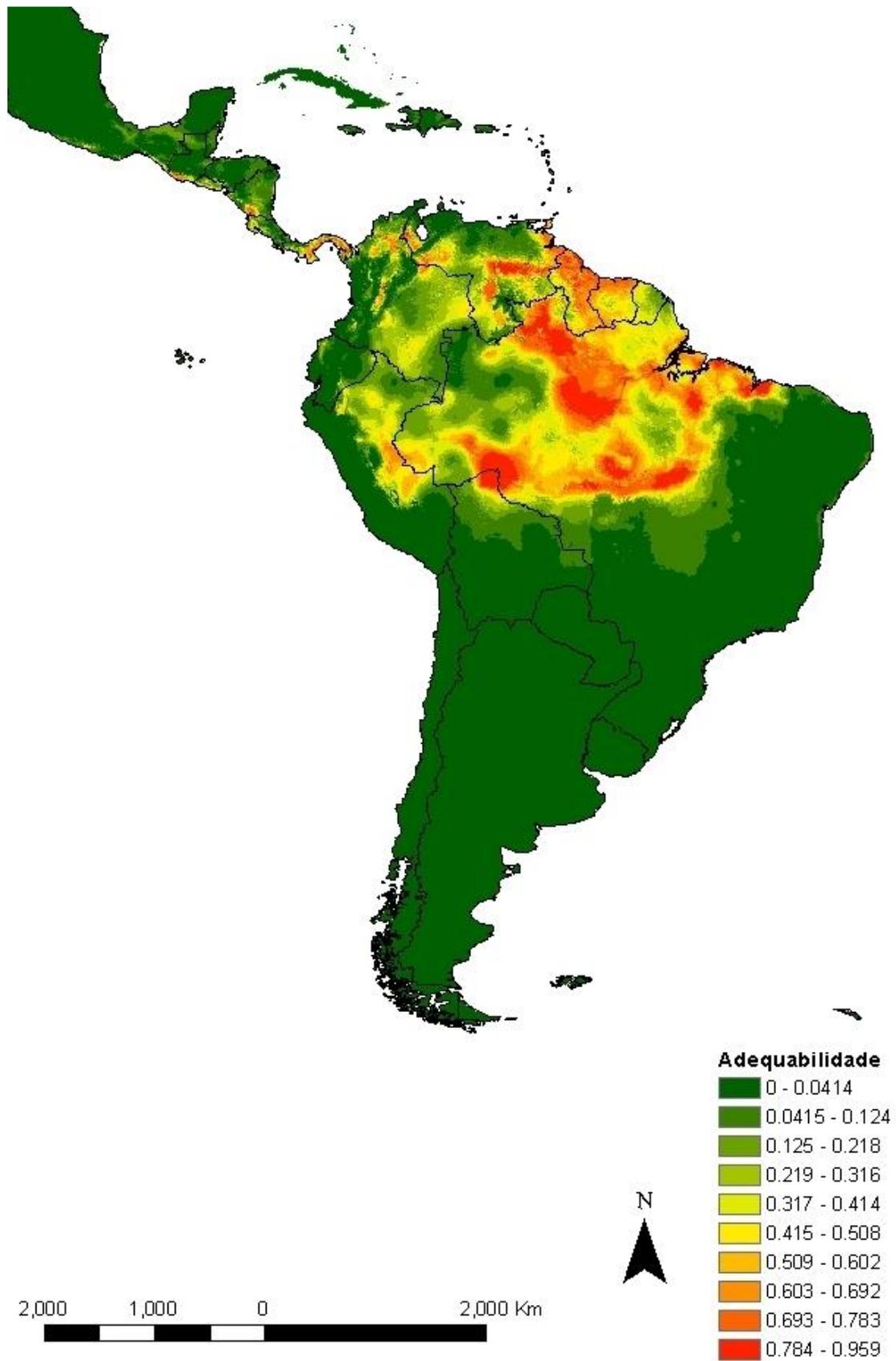


Figura 22. Área de adequabilidade de *Caryocar villosum* projetada para a América do Sul e Central.

3.4. Discussão

3.4.1. Diversidade genética

Maior diversidade genética foi observada na população FLONA do Tapajós, no Pará, com valores superiores para número médio de alelos/loco, número efetivo de alelos, número de alelos privados, riqueza alélica e heterozigiosidade esperada. No entanto, apresentou menor heterozigiosidade observada. O fato dessa região apresentar alto Índice de Fixação ($f = 0,241$ vs $f = 0,05$) e menor taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a = 0,612$ vs $\hat{t}_a = 0,905$) ajuda a explicar a menor heterozigiosidade observada, representando o excesso de homozigotos. A taxa de cruzamento aparente média ($\hat{t}_a = 0,758$) estimada para o piquiá, indica que a espécie apresenta sistema reprodutivo misto, com predominância de alogamia. A maior diversidade genética encontrada na região do Pará para a maioria dos parâmetros pode ser resultado de um viés amostral, pois nessa região foram encontrados 92 indivíduos, e em Rondônia, somente 38. Entretanto, a riqueza alélica, que mede o número médio de alelos independente do tamanho amostral utilizando o método de rarefação adaptado da diversidade ecológica (HURLBERT, 1971), apontou maior riqueza no Pará ($Ar = 11,4$ vs $Ar = 7,9$).

O estudo realizado por Collevatti et al. (2009) em uma população de piquiazérios no Rio Negro apresentou índice de fixação negativo ($f = -0,002$), mostrando que nessa região *C. villosum* não está sofrendo quedas na diversidade por causa da endogamia, diferente das regiões estudadas neste trabalho. Entretanto, altos valores do índice de fixação ($f = 0,131$) já foram observados por Collevatti et al. (2010a) em uma população de *C. brasiliense* (pequi), no cerrado. Segundo Collevatti et al. (2010b), a espécie possui, predominantemente, polinização cruzada, porém há ocorrências de autopolinização (11,4 % das sementes analisadas) e endogamia biparental, altamente variável conforme a disponibilidade de polinizadores e densidade populacional. É provável que o adensamento da região da FLONA do Tapajós (2,52 arv/ha), como já apontado no capítulo anterior, esteja aumentando a taxa de autopolinização e cruzamento entre parentes, contribuindo para o aumento da endogamia, comparado com o que está ocorrendo na RESEX, cuja população é menos adensada. Outro fator que pode estar contribuindo para aumentar o índice de fixação da região do Pará ($f = 0,241$) é a presença de alelos nulos, que são uma ocorrência comum em genotipagens feitas com microssatélites, porém causam viés na estimação de alelos e frequências alélicas,

aumentado, por exemplo, o número de genótipos homozigóticos (VAN OOSTERHOUT; WEETMAN; HUTCHINSON, 2006) e, conseqüentemente, aumento no F e desvios no EHW.

O fato dos parâmetros de diversidade genética terem sido superiores na FLONA do Tapajós, no Pará, em comparação com a população de Rondônia, pode remeter a um possível centro de origem da espécie na região do Pará. A domesticação da espécie acontece quando seres humanos realizam seleção e o efeito fundador pode ocorrer quando apenas alguns indivíduos da espécie são introduzidos em uma nova região. Ambos os eventos criam o “*bottleneck*” genético que pode diminuir a diversidade genética, mudar frequências alélicas e eliminar alelos raros na população (HYTEN et al., 2006). A diminuição na diversidade alélica (Tabela 5, Figura 14) de Rondônia, em comparação com a do Pará, pode apontar para uma potencial dispersão da espécie por humanos, no qual somente algumas variedades foram levadas de um local para outro. Isso também pode ser observado examinando a estrutura genética (Figuras 16, 17 e 19) em que se nota a presença de genótipos de Rondônia na população do Pará. Entretanto, para confirmação dessa hipótese será necessário a ampliação do número de regiões amostradas, além das duas já estudadas.

3.4.2. Estrutura genética espacial

A estrutura genética espacial em fina escala é, em geral, causada por um pedigree local devido à limitada dispersão de genes, e assim, indivíduos mais próximos geograficamente também serão mais próximos geneticamente (VEKEMANS; HARDY, 2004). As duas regiões apresentaram fracas, porém significativas, estruturas genéticas espaciais (Pará, $Sp = 0,0076$ e Rondônia, $Sp = 0,0102$), sendo os valores de coancestria inferiores ao esperado para meios-irmãos ($F_{ij} = 0,125$) (WEIR; COCKERHAM, 1984). De acordo com os padrões encontrados por Hardy e Vekemans (2004), o piquiá se enquadra como uma árvore com maiores índices de polinização cruzada ($Sp = 0.0126 \pm 0.0101$), o que é apoiado pela estimativa da taxa de cruzamento $t_a = 0,758$. Entretanto, como foi discutido no tópico anterior, no pequi já foi apontada a existência de autopolinização e cruzamentos biparentais (COLLEVATTI et al., 2010a). Essas ocorrências certamente acontecem no piquiá também, visto o alto valor dos índices de fixação encontrados somado aos resultados das estatísticas Sp .

Junto a isso, há o comportamento dos polinizadores e dispersores de semente da espécie. Segundo Martins e Gribel (2007), o piquiá tem como polinizadores os morcegos Glossophaginae e *Phyllostomus discolor*, sendo o último o principal polinizador, devido à

estrutura da flor de *C. villosum*. Essa espécie, apesar da dispersão em longas distâncias, também possui padrão forrageiro em que a mesma planta é visitada em intervalos regulares. O mesmo comportamento forrageiro é observado nos principais dispersores de semente da espécie, *Caluromys lanatus* e *C. philander*, resultando em baixa mobilidade (MARTINS; GRIBEL, 2007) e na estruturação genética espacial da espécie. O padrão forrageiro já foi observado para a *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001a) e para a *Hymenaea coubaril* (DE LACERDA; KANASHIRO; SEBBENN, 2008), onde foram vistos endogamia biparental por causa da polinização realizada por morcegos. É possível também que a restrição da dispersão de sementes contribua mais em causar estrutura genética espacial em pequena escala do que o movimento do pólen, que ocorre ao acaso e pode atingir longas distâncias (LOISELLE et al., 1995; DICK et al., 2008).

Segundo Hardy e Vekemans (2004), fatores que podem alterar a estrutura genética espacial incluem a pressão de seleção ou eventos históricos. No capítulo anterior dessa dissertação, foram mostrados indícios de que os piquiazeiros plantados em quintais em duas vilas na FLONA do Tapajós estão passando pelo processo recente de seleção e domesticação e, além disso, por serem cultivados em áreas próximas a moradias, a intervenção humana tem afetado o comportamento dos dispersores. Dessa forma, indivíduos de quintal possuem estruturação genética espacial e indivíduos presentes na mata, não possuem. A estruturação genética espacial presente na FLONA do Tapajós (Figura 15A) corresponde a estruturação encontrada nas áreas de quintais. É possível também que na RESEX Rio Ouro Preto os piquiazeiros estejam passando por alguma intervenção humana, visto a baixa, porém presente, estruturação genética espacial.

De forma comparativa, Collevatti, Grattapaglia e Hay (2001a,b) analisaram a estrutura genética espacial de *C. brasiliense* no cerrado e também encontraram classes de distâncias curtas, semelhante ao *C. villosum*, em que a estrutura genética espacial foi inferior a 5 metros. Este pode ser um padrão do gênero *Caryocar*, por alguns dos fatores em comum já mencionados, como o comportamento dos polinizadores e dispersores. O valor da estatística S_p encontrado para o pequi foi 0,0116 (COLLEVATTI et al., 2010b), superior aos encontrados para o piquiá (Pará, $S_p = 0,0076$ e Rondônia, $S_p = 0,0102$). Segundo Collevatti et al. (2010b), o que pode influenciar as mudanças nos valores de S_p de *C. brasiliense* são as variações nas densidades populacionais. Segundo Hardy e Vekemans (2004), o S_p é maior quanto menor a densidade populacional, pois os polinizadores tendem a voar maiores distâncias. Essa conclusão se aplica as duas populações estudadas, pois no Pará a densidade

populacional de 2,52 árvores/ha é superior ao encontrado em Rondônia (1,43 arv/ha), de tal forma que a estatística S_p é maior na RESEX Rio Ouro Preto em Rondônia.

3.4.3. Estrutura genética

A estrutura genética de uma espécie pode ser resultado de fatores como a migração, seleção, mutação e deriva dentro de um contexto histórico e biológico, ao longo do tempo e espaço (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Na revisão realizada com 42 espécies tropicais, Dick et al. (2008) observaram que o F_{ST} entre populações tem valor próximo a 0,177. Os autores explicam esse resultado como consequência de altos valores de endogamia, associados às baixas densidades populacionais, dependência de animais para a polinização e ao sistema misto de reprodução. Os valores de F_{ST} entre as regiões do Pará e Rondônia ($F_{ST}=0,109$) foram menores que os encontrados nas espécies tropicais revisadas por Dick et al. (2008).

O F_{ST} é uma medida histórica que mostra a diferenciação de populações de uma espécie com história evolutiva em comum. Dessa forma, a análise é construída sob a hipótese de que há apenas uma população de referência e que, na ausência de forças evolutivas, espera-se que as populações tenham as mesmas frequências alélicas e, assim, valores de F_{ST} menores (ZUCCHI et al., 2003). O pequi, também da família *Caryocar*, apresenta ciclo de vida superior a 200 anos, sendo que pelas semelhanças com o piquiá, é possível que esse também possua ciclo de vida longa. Com isso, a ocorrência de eventos evolutivos pode ainda não ter levado a grandes diferenciações entre as populações.

O F_{ST} também influencia nos valores de fluxo gênico (Nm), tendo sido encontrado alto fluxo entre as populações ($Nm = 2,043$). O alto índice de fixação ($f = 0,241$) presente no Pará, que indica endogamia, combinado com a alta densidade populacional da região (2,53 arv/ha) e o baixo índice de fixação ($f = 0,050$) junto à densidade populacional mais baixa de Rondônia (1,43 arv/ha), mostram que apesar dos polinizadores e dispersores da espécie apresentarem certo comportamento forrageiro em pequena escala, em grandes proporções o fluxo gênico acontece de forma eficiente entre populações, pois mais de 1000 km separam as duas unidades de conservação. Comportamentos semelhantes já foram observados no jatobá (*Hymenaea coubaril*), em que o cruzamento entre parentais causou estruturação genética espacial, porém dispersões a longas distâncias resultaram em baixa diferenciação entre as populações (DE LACERDA; KANASHIRO; SEBBENN, 2008). Já foi constatado, em *Ceiba pentandra*, que a polinização realizada por morcegos pode ser superior a 18 km (DICK et al.,

2007, 2008). Dessa forma, é provável que indivíduos e populações entre os estados do Pará e Rondônia devem também contribuir para manter o fluxo gênico entre as regiões.

Outro fator que pode estar colaborando para a dispersão em longas distâncias, além da eficiente polinização por morcegos, é a dispersão de sementes ao longo dos rios, visto que as duas reservas se encontram nas margens dos rios Ouro Preto (Rondônia) e Tapajós (Pará) e que os piquizeiros ocorrem em maior concentração na terra firme da região do grande estuário (SHANLEY; MEDINA, 2005). Já foi comprovado por Collevatti et al. (2009) que o Rio Negro não é uma barreira geográfica para o fluxo gênico da espécie. Entre as margens do rio foi verificada uma alta taxa de migração, entretanto, por se tratar de um estudo que analisou indivíduos dos dois lados do rio, a hipótese de dispersão pela água não foi levantada. Um possível caminho para o fluxo gênico fluvial seria no encontro na fronteira da Bolívia e Brasil entre o Rio Madeira e o Rio Mamoré, do qual o Rio Ouro Preto integra a bacia (DE CAMPOS et al., 2014).

Os resultados da AMOVA mostram que a maior parte da variação é dentro das populações (89 %), e a divergência entre as populações dos dois estados foi intermediária (11 %). Este valor é corroborado pelo teste de Mantel, que mostrou a existência de um isolamento por distância. Apesar da correlação entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas não ter sido muito elevada, esta foi significativa ($r = 0,3486$, $p\text{-valor} = 0,0001$), o que pode ser explicado pelo grande distanciamento entre as duas reservas e pela ausência de mais populações amostradas entre elas. Os fatores internos, que diferem as populações, podem ser claramente observados no método DAPC1, pois nele é visto que o Pará é formado por até 3 grupos estruturais.

Como discutido no capítulo 2, na região da FLONA do Tapajós no Pará, o piquiá está passando pelo processo de seleção e domesticação de indivíduos que são plantados em quintais. O piquiá é considerado incipientemente domesticado desde a época pré-Colombiana (CLEMENT, 2009a). Entretanto, o piquiá presente no Pará parece apresentar maior nível de domesticação do que os de Rondônia, visto que a mata de piquizeiros existente na região apresenta uma conformação de alta-densidade, principalmente em indivíduos adultos, possivelmente influenciada pela ação humana durante a época pré-Colombiana, com registros de seleção e cultivo recente de frutos doces, sendo que o gosto pode ser considerado um indicativo para a síndrome de domesticação para característica da fruta (WARD et al., 2005; DICK et al., 2008; MEYER; DUVA; JENSEN, 2012; ALVES; LEVIS; CLEMENT, 2016). A diversidade genética encontrada no Pará é semelhante a outras espécies também consideradas incipientemente domesticadas e, assim, é provável que a domesticação seja um dos principais

fatores de diferenciação interna entre as populações. Em todos os métodos utilizados para definir a estruturação genética observa-se que há certa sobreposição entre indivíduos de diferentes localidades e isso provavelmente ocorre pelo grande fluxo gênico. O fluxo gênico pode ser apontado como principal responsável por manter a diversidade entre e dentro das populações arbóreas, de forma a determinar a sua estrutura genética (DE LACERDA; KANASHIRO; SEBBENN, 2008), como visto entre as duas populações do Pará e Rondônia.

3.4.4. Potencial de distribuição de *Caryocar villosum*

Modelagens das distribuições potenciais de espécies são ferramentas numéricas que combinam observações da espécie com estimações ambientais, que podem ser usados para fazer inferências ecológicas e evolucionárias ao projetar a distribuição da espécie pela paisagem (ELITH; LEATHWICK, 2009). O modelo encontrado nesse estudo mostra como a precipitação anual e a temperatura sazonal são os fatores abióticos mais importantes para explicar a distribuição do *C. villosum*, com base nos dados de presença usados. Em geral, esses fatores são os que mais contribuem para a distribuição de espécies e biomas (ARAÚJO; LUOTO, 2007; WIENS, 2011), como observado para *Bixa orellana* var. *urucurana*, o ancestral silvestre do urucum, cujos fatores mais importantes na predição de sua distribuição foram a precipitação do quadrimestre mais frio (23,5 %), temperatura sazonal (17,5 %), precipitação do mês mais úmido (12,4 %), e precipitação anual (11,5 %) (DEQUIGIOVANNI et al., 2018).

Os habitats favoráveis para *C. villosum* apresentam pouca variação nas temperaturas por estações e variações de precipitação entre 1500-3000 mm. A modelagem feita com base em haplótipos do gênero *Caryocar* também classificou *C. villosum* como pertencente à Amazônia, porém com concentração no oeste amazônico, juntamente com as espécies *Caryocar glabrum* e *C. pallidum* (COLLEVATTI et al., 2012). Entretanto, boa parte do oeste da Amazônia não apresenta adequabilidade para abrigar a espécie de acordo com os critérios abióticos analisados, provavelmente devido a intensidade de chuvas nessa região, sem época de seca ou somente, sub-seca, conforme o mapa climático proposto pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2002).

Comparando os mapas de distribuição (Figuras 21 e 22) com o mapa climático proposto pelo IBGE (2002) no Brasil, a região em que o piquiá melhor se adequa apresenta climas quentes, com médias superiores a 18°C todos os meses, e úmido, apresentando entre 1 a 3 meses de seca, sendo a região oeste (super úmida), não adequada para espécie. A espécie

apresentou alta capacidade de adequação no norte do Mato Grosso, no leste do Amazonas, nos estados de Roraima, Tocantins e Maranhão. Ainda no modelo original, há a adequação da espécie nos países Suriname e nas Guianas, assim como possui alta adequabilidade na Venezuela. Com o modelo projetado, é observada uma certa adequabilidade no Panamá, Costa Rica, Nicarágua, El Salvador e Guatemala, principalmente em áreas litorâneas. No entanto, nenhuma base de dados apontou a ocorrência de *C. villosum* em países que não pertencem a América do Sul, pois, segundo Clay, Sampaio e Clement (2000), a espécie ainda não ultrapassou os limites marcados pelo escudo das Guianas ao norte.

Os resultados da diversidade genética apontam para um possível centro de origem na região do Pará, devido à maior diversidade alélica. Essa região é concomitante com o centro de diversidade da Amazônia Central definido por Clement (1999b), onde já era apontada uma possível presença para *C. villosum*. A modelagem também apontou grande potencial de ocorrência em Rondônia, Roraima, no leste do Amazonas e norte do Mato Grosso do Sul. Todas essas localidades foram consideradas regiões de diversidade, centros de diversidade menores e maiores por Clement (1999b), começando pelo Noroeste da Amazônia e se estendendo à região do Solimões, Amazônia Central, Alto Rio Negro/Orinoco, Estuário Amazônico, Ilha do Marajó e por fim, Orinoco Médio. Amostrar e estudar essas regiões pode levar ao melhor entendimento da diversidade e domesticação da espécie. Outro fator que pode ser melhor compreendido é o fluxo gênico da espécie. Para isso é necessário percorrer áreas entre a faixa Rondônia e Pará e assim determinar se o fluxo gênico ocorre em maiores proporções pela ação de morcegos ou dispersão pela água.

As áreas com maior adequabilidade do *C. villosum* são coincidentes com áreas de maior riqueza de espécies domesticadas encontrada por Levis et al. (2017), que foram as regiões do Sudeste Amazônico (South West Amazonia - SWA), Sul Amazônica (Southern Amazonia - SA) e Amazônia Oriental (Eastern Amazonia - EA). Os autores explicam que as condições ambientais controlam a abundância e riqueza de espécies domesticadas e podem ter influenciado onde e como os seres humanos moldaram a floresta. Principalmente na região do Pará (EA), o possível centro de origem da espécie, o número de meses secos é o que mais influencia a abundância e riqueza das espécies (LEVIS et al., 2017). Delimitar as áreas de ocorrência é de grande importância devido ao atual cenário de mudanças climáticas. Sob o cenário de mudanças climáticas, poderão ocorrer transições em áreas com climas favoráveis e, conseqüentemente, espécies em certos níveis de ambientes de maior adequabilidade irão persistir e formar as novas gerações em relação a outras, menos adequadas (DINIZ-FILHO et al., 2010; COLLEVATTI; NABOUT; DINIZ-FILHO, 2011). Por causa da intrínseca

associação entre espécies e suas características ecológicas no nível de bioma, é esperado que parte da variação genética seja explicada por mudanças nessas escalas (DINIZ-FILHO et al., 2009), e assim se dá a necessidade de estudá-las em conjunto.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. P.; LEVIS, C.; CLEMENT, C. R. Use and Management of *á* Suggest in situ Domestication along the Lower Tapajós River, Brazilian Amazonia1. **Economic Botany**, v. 70, n. 2, p. 198–202, 2016.
- ADAMACK, A. T.; GRUBER, B. *PopGenReport*: simplifying basic population genetic analyses in R. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 4, p. 384–387, 2014.
- ARAÚJO, M. B.; LUOTO, M. The importance of biotic interactions for modelling species distributions under climate change. **Global Ecology and Biogeography**, v. 16, n. 6, p. 743–753, 2007.
- BOX, G. E.P. Science and statistics. **Journal of the American Statistical Association**, v. 71, n. 356, p. 791–799, 1976.
- BROWN, J. L. SDMtoolbox: A python-based GIS toolkit for landscape genetic, biogeographic and species distribution model analyses. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 7, p. 694–700, 2014.
- CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R. Selected Species and Strategies To Enhance Income Generation From Amazonian Forests. May, p. 115–146, 1993.
- CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. de T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade Amazonica - exemplos e estratégias de utilização**. 1. ed. Manaus- AM: Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico 2000, 2000.
- CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. II. Crop biogeography at contact. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 203–216, 1999a.
- CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 188–202, 1999b.
- COLLEVATTI, R. G.; HAY, J. D. Kin structure and genotype-dependent mortality: A study using the neotropical tree *Caryocar brasiliense*. **Journal of Ecology**, v. 99, n. 3, p. 757–763, 2011.
- COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, n. 6, p. 748–756, 1999.

- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349–356, 2001a.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, n. 1, p. 60–67, 2001b.
- COLLEVATTI, R. G.; LEOI, L. C. T.; LEITE, S. A.; GRIBEL, R. Contrasting patterns of genetic structure in *Caryocar* (Caryocaraceae) congeners from flooded and upland Amazonian forests. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, n. 2, p. 278–290, 2009a.
- COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Seed abortion in the bat pollinated Neotropical tree species, *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). **Botany**, v. 87, n. 11, p. 1110–1115, 2009b.
- COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics and Genomes**, v. 6, n. 4, p. 555–564, 2010a.
- COLLEVATTI, R. G.; LIMA, J. S.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. de C. Spatial genetic structure and life history traits in Cerrado tree species: inferences for conservation. **Natureza & Conservação**, v. 08, n. 01, p. 54–59, 2010b.
- COLLEVATTI, R. G.; NABOUT, J. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Range shift and loss of genetic diversity under climate change in *Caryocar brasiliense*, a Neotropical tree species. **Tree Genetics and Genomes**, v. 7, n. 6, p. 1237–1247, 2011.
- COLLEVATTI, R. G.; LIMA-RIBEIRO, M. S.; SOUZA-NETO, A. C.; FRANCO, A. A.; DE OLIVEIRA, G.; TERRIBILE, L. C. Recovering the demographical history of a Brazilian cerrado tree species *Caryocar brasiliense*: Coupling ecological niche modeling and coalescent analyses. **Natureza & Conservação**, v. 10, n. 2, p. 169–176, 2012.
- DE CAMPOS, S. V.; DOS SANTOS, J. M.; DO NASCIMENTO, C. M.; CARNEIRO, L. L.; MARTINS, J.; PINTO, M. G. M.; FERREIRA, T. D.; BELLONI, R.; NIENOW, S.; POLLI, A.; CRUZ, F.; MEIRELLES, G. Plano de Manejo Reserva Extrativista do Rio Ouro Preto/ RO. **Ministério do Meio Ambiente**, p. 184, 2014.

- DE LACERDA, A. E. B.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A. M. Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of a tropical tree hymenaea courbaril in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, v. 40, n. 4, p. 462–470, 2008.
- DEQUIGIOVANNI, G.; RAMOS, S. L. F.; ALVES-PEREIRA, A.; FABRI, E. G.; PICANÇO-RODRIGUES, D.; CLEMENT, C. R.; GEPTS, P.; VEASEY, E. A. Highly structured genetic diversity of *Bixa orellana* var. *urucurana*, the wild ancestor of annatto, in Brazilian Amazonia. **Plos One**, v. 13, n. 6, p. e0198593, 2018.
- DICK, C. W.; BERMINGHAM, E.; LEMES, M. R.; GRIBEL, R. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 14, p. 3039–3049, 2007.
- DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 20–33, 2008.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; NABOUT, J. C.; BINI, L. M.; LOYOLA, R. D.; RANGE, T. F.; NOGUES-BRAVO, D.; ARAÚJO, M. B. Ensemble forecasting shifts in climatically suitable areas for *Tropidacris cristata* (Orthoptera: Acridoidea: Romaleidae). **Insect Conservation and Diversity**, v. 3, n. 3, p. 213–221, 2010.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; NABOUT, J. C.; BINI, L. M.; SOARES, T. N.; DE CAMPUS TELLES, M. P.; DE MARCO, P.; COLLEVATTI, R. G. Niche modelling and landscape genetics of *Caryocar brasiliense* (“Pequi” tree: Caryocaraceae) in Brazilian Cerrado: An integrative approach for evaluating central-peripheral population patterns. **Tree Genetics and Genomes**, v. 5, n. 4, p. 617–627, 2009.
- DOYLE, J. .; DOYLE, J. . Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- 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, 2012.
- ELITH, J.; LEATHWICK, J. R. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, n. 1, p. 677–697, 2009.
- FEILHAUER, H.; HE, K. S.; ROCCHINI, D. Modeling species distribution using niche-based proxies derived from composite bioclimatic variables and MODIS NDVI. **Remote Sensing**, v. 4, n. 7, p. 2057–2075, 2012.

- GOUDET, J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 184-186, 2005.
- HARDY, OLIVER J., & VEKEMANS, X. spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels OLIVIER. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 618–620, 2002.
- HARTL, D. L.; G, A. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- HYTEN, D. L.; SONG, Q.; ZHU, Y.; CHOI, I.; NELSON, R. L.; COSTA, J. M.; SPECHT, J. E.; SHOEMAKER, R. C.; CREGAN, P. B. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 45, p. 16666-16671, 2006.
- HURLBERT, S. H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, v. 52, n. 4, p. 577-586, 1971.
- IBAMA. Plano de Manejo - Floresta Nacional do Tapajós. v. I, p. 2–165, 2004.
- IBGE. **Mapa de clima do Brasil**. Rio de Janeiro, 2002.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1801–1806, 2007.
- JOMBART, T.; AHMED, I. *adeget* 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 3070–3071, 2011.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.; PRITCHARD, J.; STEPHENS, M. et al. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, p. 94, 2010.
- KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRÜNWARD, N. J. *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ**, v. 2, p.281, 2014.
- KEENAN, K.; MCGINNITY, P.; CROSS, T. F.; CROZIER, W. W.; PRODÖHL, P. A. DiveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 8, p. 782–788, 2013.

- LEVIS, C.; COSTA, F. R. C.; BONGERS, F.; PEÑA-CLAROS, M.; CLEMENT, C. R.; JUNQUEIRA, A. B.; NEVES, E. G.; TAMANAHA, E. K.; FIGUEIREDO, F. O. G.; SALOMÃO, R. P.; CASTILHO, C. V.; MAGNUSSON, W. E.; PHILLIPS, O. L.; GUEVARA, J. E.; SABATIER, D.; MOLINO, J.-F.; CARDENAS LOPEZ, D.; TER STEEGE, H. Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition. **Science**, v. 931, n. March, p. 925–931, 2017.
- LOISELLE, B. A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, n. 11, p. 1420–1425, 1995.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ecology & Genetic Structure**, p. 65–95, 1984.
- MARTINS, R. L.; GRIBEL, R. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 37–45, 2007.
- MEYER, R. S.; DUVAL, A. E.; JENSEN, H. R. Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. **New Phytologist**, v. 196, n. 1, p. 29–48, 2012.
- MORAES, R. P. **Conservação socio-ambiental do piquiá na região dos lagos Parú e Calado, no município de Manacapuru, AM.** 2011. Dissertação (Mestre em Ciências do Ambiente - Centro de Ciências do Ambiente, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist** v. 106, n. 949, p. 283–292, 1972.
- 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, 2012.
- PHILLIPS, S. J.; DUDÍK, M. Modeling of species distribution with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. **Ecography**, v. 31, n. 2, p. 161–175, 2008.
- PINTO, A.; AMARAL, P.; GUIMARÃES, J.; SOUSA, S.; SAMPAIO, L. Índice de Preço de Produtos da Floresta. **Imazon**, v. 2, p. 12, 2011. Disponível em: <[http://imazon.org.br/PDFimazon/Portugues/preco de produtos da floresta/Boletim_IndicePreco_18ago2012.pdf](http://imazon.org.br/PDFimazon/Portugues/preco_de_produtos_da_floresta/Boletim_IndicePreco_18ago2012.pdf)>.
- PRANCE, G. T.; DA SILVA, M. F. A Monograph of Caryocaraceae. **Flora Neotropica**, v. 12, p. 1–75, 1973.

- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, P.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.
- PULLIAM, H. R. On the relationship between niche and distribution. **Ecology Letters**, v. 3, n. 4, p. 349–361, 2000.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. 1. ed. Belém-PA: Cifor, Imazon, 2005.
- SLATKIN, M.; BARTON, N. H. A Comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v. 43, n. 7, p. 1349–1368, 1989.
- VAN OOSTERHOUT, C.; WEETMAN, D.; HUTCHINSON, W. F. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 255–256, 2006.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 921–935, 2004.
- VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, n. 3, p. 349–351, 1994.
- WARD, M.; DICK, C. W.; GRIBEL, R.; LOWE, A. J. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in Neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 246–254, 2005.
- WEIR, B.S. AND COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358–1370, 1984.
- WIENS, J. J. The niche, biogeography and species interactions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 366, n. 1576, p. 2336–2350, 2011.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p.395-420, 1951.
- ZUCCHI, M.; BRONDANI, R. P. V; PINHEIRO, J.; CHAVES, L. J.; COELHO, a S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 449–457, 2003.

4. CONCLUSÕES

- Nos piquiazeiros da Flona do Tapajós presentes em estado silvestre (na mata) foi observado maior riqueza alélica, número de alelos, número de alelos efetivos, alelos privados e heterozigosidade observada, determinando sua maior diversidade em relação aos cultivados em quintais.
- A estrutura genética especial foi significante apenas entre indivíduos cultivados em quintais, com parentesco entre os piquiazeiros em até 4 metros, provavelmente resultado da escolha de frutos adocicados pela ação humana, barreiras para polinização e dispersão. Essas ações recentes podem resultar em indivíduos juvenis estruturados, pois indivíduos adultos já passaram pelo processo de competição.
- Observou-se baixa estruturação genética entre os grupos mata/quintal nos métodos aplicados. Apesar da série de práticas de manejo aplicadas para promover o piquiá, os resultados mostram que a população ainda não passou por um processo de domesticação acentuado. A seleção tanto por frutos doces quanto para extração de óleo, assim como o grande fluxo gênico entre piquiazeiros, pode estar contribuindo para não diferenciar profundamente os grupos.
- Comparando piquiazeiros encontrados na FLONA do Tapajós, no Pará, com piquiazeiros encontrados em Rondônia, a região do Pará mostrou valores superiores de diversidade e pode estar indicando um centro de origem da espécie.
- Ambas as localidades apresentaram estrutura genética espacial entre os indivíduos, com distâncias máximas de 10 m no Pará e 3 m em Rondônia, sendo os valores de coancestria encontrados nas duas localidades inferiores ao esperado para meios-irmãos, indicando a predominância de polinização cruzada. A estruturação espacial pode estar refletindo o comportamento forrageiro dos principais dispersores e polinizadores da espécie.
- A estrutura genética deixa clara a separação entre as duas localidades (Pará e Rondônia), apesar do grande fluxo gênico encontrado entre as populações.
- Conforme a modelagem de nicho ecológico, a distribuição da espécie está ligada à precipitação anual e à temperatura sazonal. Comparando o modelo com dados do IBGE, a região em que o piquiá melhor se adequa apresenta climas quentes, com médias superiores a 18°C todos os meses, e úmido, apresentando de 1 a 3 meses de seca.