

**Avaliação da diversidade genética de populações naturais  
de Pau -rosa (*Aniba rosaeodora*, Ducke) por meio de  
marcadores moleculares RAPD**

Ronaldo Pereira Santos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Integrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA/UFAM, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, com área de concentração em Ciências de Florestas Tropicais.

Manaus, Abril de 2004

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA**  
**PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E**  
**RECURSOS NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS**

**Avaliação da diversidade genética de populações naturais de Pau -  
rosa (*Aniba rosaeodora Ducke*) por meio de marcadores moleculares**  
**RAPD**

Ronaldo Pereira Santos  
**Orientador:** Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio

**Fonte Financiadora:**  
**Convênio 086/ 1 MMA/FNMA**  
**Processo N<sup>o</sup> 02000.009184/01-98**  
**International Fellowship Program of Ford Foundation**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Integrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA/UFAM, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, com área de concentração em Ciências de Florestas Tropicais.

Manaus, Abril de 2004

Santos, Ronaldo P.

Avaliação da diversidade genética de populações naturais de Pau – rosa (*Aniba rosaeodora*, Ducke) por meio de marcadores moleculares RAPD / Ronaldo Pereira Santos. – 2004.

Manaus: INPA/UFAM, 2004

83 pp.:il

Dissertação de mestrado: Universidade Federal do Amazonas / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2004.

Sinopse:

Plantas adultas e regenerantes de Pau-rosa foram avaliadas quanto a variabilidade genética e endemização na Reserva Ducke. Complementarmente, quatro populações oriundas de município do Amazonas foram avaliadas quanto à diversidade e diferenciação genética.

Palavras- chaves: *Aniba rosaeodora*, diversidade genética, fluxo gênico, RAPD, marcador molecular, genética de populações.

Key words: *Aniba rosaeodora*, genetic diversity, gene flow, RAPD, molecular marker, populations genetic.

Talles,

Quando você já for capaz de ler e compreender estas frases, espero que se encoraje a conquistar muito mais do que ainda irei conquistar.

Se não fossem as dificuldades, nossas conquistas não passariam de meras fatalidades, por isso acredito...nada é por acaso.

## Agradecimentos

Aos meus pais, que apesar da dor da distância, acreditaram que seus filhos poderiam ir mais longe que suas histórias prediziam;

Meus muitos irmãos, caminhei e caminho pensando em vocês também;

Meus mestres queridos desde o primário, eles me encorajaram a estar escrevendo este trabalho;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a mãe – escola inesquecível;

À professora Dra. Maria Goréte nesta mesma universidade, pois foi minha primeira conselheira acadêmica;

Aqui em Manaus, terra que me acolhe são muitos agradecimentos:

A esta respeitável instituição, o INPA, por fazer valer os sonhos de tantos;

Paulo de Tarso, meu orientador, obrigado pelo apoio e logística necessários;

Ao coordenador deste curso, José Francisco, agradeço especialmente por ter conquistado junto comigo o apoio da Fundação Ford e a busca pela excelência do nosso curso;

Ao pessoal da Fundação Carlos Chagas, tão competentes na condução do Programa de bolsas da Fundação Ford, o qual sou eternamente grato pelas oportunidades de que me deu de chegar mais longe;

A Embrapa Amazônia Ocidental, pelo espaço e infra-estrutura, sem os quais este trabalho não sairia do papel. Nesta instituição agradeço em especial a Augusta (Biblioteca) pelas dezenas de *papers*; a Paula Cristina, minha co-orientadora, pela paciência e ensinamentos científicos e ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, Jéferson, Cristiane e Socorro, não poderia esquecer de vocês. Regina Quirsen, pelo espaço no Laboratório e acesso a tudo que foi necessário.

Meus amigos desde a Universidade Rural, Juliana, Ulysses, Euler e Adeilson obrigado pela amizade e companheirismo e ao Alan, colega de república.

O obrigado final e especial é para Patrícia Sales. Você que sabe o que passei nesta dissertação para chegar até aqui; e eu sei o que você passou também, nunca esquecerei; Se não fosse por você muita coisa neste trabalho não seria realizada. Portanto, saiba que é uma pessoa muito especial pra mim....muito obrigado.

## Sumário

Lista de Figuras .....	7
Lista de Tabelas.....	10
Resumo .....	11
Abstract .....	12
Introdução geral .....	13
Capítulo 1. Aprimoramento das condições de PCR para Pau-rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke) e desenvolvimento de um critério de seleção de bandas RAPD baseado no grau de reprodutibilidade.....	18
1.1.Introdução .....	18
1.2. Material e métodos .....	20
1.3. Resultados e discussão.....	25
1.4.Conclusões .....	31
Capítulo 2. Análise da diversidade genética para duas gerações de Pau-rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke) da Reserva Ducke (Manaus/AM) revela indícios de endemização.....	32
2.1.Introdução .....	32
2.3. Material e métodos .....	34
2.3. Resultados .....	38
2.4. Discussão .....	44
2.5.Conclusões .....	50
Capítulo 3. Estimativas da diversidade e divergência entre quatro populações naturais de Pau-rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke) utilizando marcadores RAPD.....	51
3.1.Introdução .....	51
3.4. Material e métodos .....	53
3.3. Resultados .....	56
3.4. Discussão .....	62
3.5.Conclusões .....	66
4. Considerações Finais .....	67
5. Referências bibliográficas .....	69

## Lista de Figuras

### Capítulo 1.

**Figura 1.** Resultado de eletroforese, em gel de agarose a 1,0%, de ácidos nucléicos extraídos de folhas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) coletadas em tubos de polietileno com grânulos de sílica e armazenadas em “freezer” a -20 °C, até o momento da utilização. **A** - Extrações conforme Edwards *et al.* (1991). **B** - Extrações conforme Khanuja *et al.* (1999). **C** - Extrações conforme Doyle & Doyle (1987). Foram aplicados 8 µL da solução de ácidos nucléicos obtida ao final das preparações em cada poço do gel. **M** - λ/HindIII 1,0 µg.....22

**Figura 2.** Resultados de eletroforese de ensaios RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em que foi testada a necessidade da inclusão de BSA nas reações de PCR. **A** - reações em que não foi adicionada BSA. **B** - reações em que foi adicionada BSA, na concentração de 0,1%. **M** - λ/HindIII. A seqüência do “primer” utilizado para os experimentos foi 5'-ACG GCG TAT G-3'.....26

**Figura 3.** Resultados de eletroforese de ensaios RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em que foi testada, banda a banda, a reprodutibilidade dos padrões. O DNA de 20 plantas foi amplificado, utilizando as mesmas condições, em ocasiões diferentes. **A** e **B** são os resultados obtidos nestas duas ocasiões. Os números identificam os indivíduos e indicam o padrão de bandas referente a cada um deles. As letras minúsculas de **a** até **m** identificam bandas que compõem padrões RAPD-PCR avaliadas neste experimento. **M** - λ/HindIII. O grau de reprodutibilidade para cada banda desta Figura 3 está indicado na Tabela 1. Estão apresentados os negativos das fotos captadas pelo sistema de documentação Kodak “Digital Science DC120 Zoom Camera Kit, Gel documentation Accessory Kit and 1D Image Analysis Software”.....27

**Figura 4** - Número médio de índices de auto-similaridade iguais a 1 (um) e desvio do número médio, para tratamentos aplicados a padrões de bandas RAPD, obtidos para 11 grupos (cada um submetido à PCR com um “primer” diferente), cada grupo contendo 8 a 20 plantas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Os índices foram calculados aplicando a fórmula de Jaccard aos padrões produzidos para as mesmas plantas em ocasiões diferentes. **Tratamento 1:** nenhum critério de reprodutibilidade foi aplicado, ou seja, todas as bandas geradas por RAPD-PCR foram admitidas para o cálculo dos índices; **tratamento 2:** apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 90% foram admitidas para o cálculo dos índices; **tratamento 3:** apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 80% foram admitidas para o cálculo dos índices e **tratamento 4:** apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 70% foram admitidas para o cálculo dos índices.....29

## Capítulo 2.

- Figura 1.** Distribuição de plantas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora*, Ducke) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, que fica a 26 km do centro de Manaus – AM. A área hachurada na reserva equivale a um platô central de maior cota que divide a área. O símbolo ● são as plantas adultas que apresentaram plantas juvenis sob a copa; ☆ são as demais plantas adultas. Plantas marcadas com a letra “A” são componentes do grupo Oeste e “B” componentes do grupo Leste.....35
- Figura 2.** Padrão eletroforético de fragmentos RAPD-PCR do “primer” P40 em plantas adultas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). As setas destacam dois fragmentos (F1 e F2) presentes apenas em adultas do lado Oeste. M= marcador de peso molecular 1 Kb Ladder Plus e C = reação controle.....40
- Figura 3.** Ocorrência e distribuição de três *loci* RAPD com baixa frequência em plantas adultas e regenerantes de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM). As plantas adultas estão representadas pelos símbolos maiores: ● adultas com regenerantes sob a copa; ○ adultas sem regenerantes sob a copa. Plantas regenerantes estão representadas pelo símbolo (●). Dentro dos retângulos, regenerantes que estavam sob a copa da mesma planta adulta.....41
- Figura 4.** Agrupamento de 99 amostras de Pau-rosa com similaridade de Jaccard e agrupamento Ligação Média Dentro do Grupo pelo programa GENES. Plantas do lado OESTE legendadas com a letra “A” e oeste “B”. Os retângulos e as elipses representam para o lado Oeste e Leste, respectivamente, os agrupamentos entre adultas e regenerantes no ramo mais próximo do dendrograma.....42
- Figura 5.** Representação bidimensional da Análise de Componentes Principais (PCA) entre as plantas adultas e regenerantes de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) de dois lados (OESTE e LESTE) da Reserva Ducke. As plantas dentro dos círculos são as adultas. No Oeste as plantas regenerantes estão mais agrupadas em torno das adultas que as do lado Leste. A percentagem de variabilidade explicada pelos eixos: PC1 36,06% e PC2 5,33% .....43

## Capítulo 3.

- Figura 1.** Localização dos pontos onde foram coletadas as amostras de indivíduos adultos de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). A-Reserva Ducke (Manaus); B-Silves; C-Maués e D-Parintins. O círculo destaca área sujeita a alagamento no período da subida do rio entre Maués e Silves. Fonte: ISLAB–INPA (Landsat TM).....55
- Figura 2.** Padrão eletroforético de bandas RAPD-PCR em amostras de quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): A-Ducke; B- Maués; C-Silves e D-Parintins. M= marcador 1 Kb Ladder. O fragmento com tamanho médio de 650 pb aparece nas populações C e D .....56



**Figura 3.** Agrupamento de quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) utilizando as distâncias de Nei (1978) e o critério UPGMA. Em cada ramo, o valor da porcentagem de *loci* que dá suporte a análise.....57

**Figura 4.** Agrupamento de todos os indivíduos de quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). A-Reserva Ducke (Manaus); B- Silves; C-Maués e D-Parintins. O índice de similaridade utilizado foi o de Jaccard e o agrupamento UPGMA.....60

**Figura 5.** Representação bidimensional da Análise de Componentes Principais entre quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) calculados em marcadores moleculares RAPD – PCR. Populações: A-Manaus (●); B-Silves (†); C-Maués (▽) e D-Parintins (○). O eixo PC1 explica 25,58% da diversidade e o PC2 10,10%.....61

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1.

**Tabela 1.** Frequência e grau de reprodutibilidade de bandas geradas por RAPD – PCR em um “primer” .....28

### Capítulo 2.

**Tabela 1 .** Seqüência dos “Primers” utilizados para gerar fragmentos RAPD para plantas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). da Reserva Florestal Adolpho Ducke, com indicação do número de bandas totais e polimórficas, percentagem de polimorfismo e a o tamanho da maior e menor bandas geradas por cada “primer” .....38

**Tabela 2.** Índices referentes a uma população natural de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) remanescente na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus – AM), calcados em dados de marcadores RAPD .....39

### Capítulo 3.

**Tabela 1.** Matriz de dados calculados para quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), referentes à distância geográfica em km (DG), identidade genética (ID) (Nei, 1972) e fluxo gênico ( $Nm$ ) (número de migrantes por geração).....58

**Tabela 2.** Índices gerados com marcadores moleculares RAPD para quatro populações de Pau – rosa oriundas de quatro municípios do Estado do Amazonas.....59

## Resumo

Este trabalho foi realizado com o Pau – rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), espécie submetida a exploração predatória na Amazônia Central onde objetivou-se: (i) definir e padronizar metodologias de coletas para extração de DNA e reações PCR - RAPD e desenvolver um critério para seleção de bandas reprodutíveis; (ii) avaliar a variabilidade genética em duas gerações (adultas e regenerantes), de plantas da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM) e ao mesmo tempo averiguar a ocorrência de endemização para plantas agrupadas nos baixios (Lado Oeste) e no platô (Lado Leste) da Reserva e (iii) estimar a diversidade e a diferenciação para quatro populações naturais encontradas em Maués, Parintins, Manaus e Silves. Nove *primers* geraram 107 bandas sendo 90 polimórficas (84,11%). A tendência para endemização foi detectada e o fluxo gênico foi maior entre os dois lados da Reserva Ducke ( $Nm = 32,90$ ) do que entre as plantas agrupadas de cada lado da Reserva (Oeste:  $Nm = 10,68$  e Leste:  $Nm = 6,66$ ). Os valores de diversidade, os padrões de agrupamento das adultas e regenerantes (dendrograma e PCA) juntamente com as taxas de fluxo gênico, fizeram com que haja a suposição de grande influência dos pássaros dispersores das sementes de Pau – rosa na estrutura populacional da Reserva. Verificou-se, também, que há uma ligeira redução de diversidade para as regenerantes, o que pode ter causa na exploração ocorrida na área antes da implantação da Reserva. Para quatro populações naturais localizadas em Silves, Maués, Parintins e Manaus (Reserva), quatro *primers* geraram 51 bandas sendo 50 polimórficas (98,04%). A diversidade está concentrada dentro das populações ( $Ht = 80,1\%$ ) com altos índices de diversidade (polimorfismo de 72,54 a 82,30% e heterozigosidade estimada entre 0,29 a 0,33), condizentes com os dados para as outras espécies tropicais arbóreas. A população de Manaus (Reserva Ducke) foi a mais diversa, e este resultado pode ser reflexo da proteção desta população na Reserva a partir de 1960 e à continuidade do processo de exploração nas outras populações. O “Exact test” indicou distribuição significativamente diferente entre os marcadores para todas as populações ( $p = 0,05$ ). Já o teste de Mantel, para correlação entre as distâncias genéticas e fluxo gênico gerou um índice  $r = - 0,99$ ;  $p = 0,09$  e entre os índices de fluxo gênico e distâncias geográficas  $r = - 0,76$  ( $p = 0,17$ ), indicando um padrão de estruturação desta diversidade entre as populações, provavelmente em forma de “cline”. Apesar de ameaçado de extinção, o Pau - rosa possui altos valores de diversidade, embora tenha havido alguma perda de diversidade para as regenerantes, na Reserva Ducke.

## Abstract

This work was carried out in Rosewood (*Aniba rosaeodora Ducke*), a very exploited Amazon species in order to: (i) define the best methodologies for sample collection and DNA purification, RAPD - PCR reactions standardization and development of a criteria to evaluate band amplification reproducibility; (ii) to evaluate the genetic variability in two generations of plants (mature and juvenile stages) at the Forest Park named Adolpho Ducke (Manaus- AM, Brazil) and search for cues of endemization in sets of plants found in “baixio” areas (plants grouped in the Western side of the Park) and in “platô” areas (at the Eastern side) and (iii) to estimate genetic diversity and differentiation for natural populations located in Manaus (A), Silves (B) Maués (C) and Parintins, (Amazonas State, Brazil). RAPD reactions generated 107 fragments from which 90 were polymorphic (84.11%). Endemization was detected and gene flow index was larger ( $N_m = 32.9$ ) between plants from the Western and the Eastern sides of the Forest Park than within each side ( $N_m = 10.68$ , Western side and  $N_m = 6.66$ , Eastern side, indexes found taking mature plants as a group and juvenile plants as the other). The diversity index, clustering of mature and juvenile plants (showed by dendrogram and bidimensional distribution - PCA) and gene flow rates were considered to raise the hypothesis of the indispensability of birds as Rosewood seed dispersers and tiny insects as pollen transporters at the Park. It has been observed, also, a slight decrease of genetic diversity in juvenile plants generation; all these observations together being considered effects of non planned exploitation at this area before it was turned an area of biodiversity protection. In Plants from A, B, C and D population's four random primers produced 51 bands from which 50 were polymorphic (98.04%). The greatest fraction of genetic diversity was detected within populations ( $H_t = 80.10\%$ ), the percentage of polymorphic loci ranged from 72.54 to 82.30% and heterozygosity estimations were from 0.29 to 0.33). Similar results have been found for others tropical tree species. The population placed in Manaus (Forest Park) presented higher diversity indexes than the other ones. This result was associated with the cessation of the exploration process at the Park 40 years ago, what is not true to the other populations. The Exact test pointed out significant differences in distribution of RAPD markers for populations ( $p = 0.05$ ). Mantel test for correlations between flow gene and genetic distance measurements resulted in  $r = - 0.99$  ( $p = 0.09$ ) and between gene flow and geographic  $r = - 0.76$  ( $p = 0.17$ ) indicating the existence of a structured model, probably in clines, to explain population diversification. Even classified as a species in risk of extinction, genetic diversity indexes presented in this work was seen to be relatively high, although it has been detected a slight reduction in diversity at Adolpho Ducke's Forest Park, besides it has been protected from exploitation since 1960.

## Introdução geral

A riqueza biológica encontrada na Região Amazônica é uma das características que mais chama a atenção dos estudiosos. A diversidade de organismos, hoje denominada de Biodiversidade (Wilson, 1988) é uma das mais exuberantes entre todos os ambientes do planeta (Whitmore, 1988; Wilson, 1988; Mittermeier *et al.*, 1992).

O potencial de utilização dessa diversidade como forma de geração de riqueza é enorme, seja no campo da alimentação, dos fármacos e da indústria química, sobretudo com a utilização das ferramentas biotecnológicas, fomentando o desenvolvimento econômico e social. Por outro lado, existe alguns riscos associados ao aproveitamento destes recursos através de programas de desenvolvimento regional (Putz *et al.*, 2000; Salati & Ferreira, 2000; Laurence *et al.*, 2001; Nepstad *et al.*, 2002), o que tem levado, este ecossistema em particular, a preocupantes degradações e extinções de espécies (Grainer, 1993; Fearnside, 1999; Gascon *et al.*, 2001). As preocupações quanto à redução da diversidade genética e às tentativas de sua utilização de forma sustentável foram bem delimitadas na Convenção sobre Diversidade Biológica, a UNCED/Rio – 92. Desde então, o tema conservação de plantas tem sido debatido e discutido intensamente, de maneira interdisciplinar, uma vez que outros setores da sociedade, como indústria e economia, têm interesse direto na manutenção da mesma (Heywood & Iriondo, 2003)

A diversidade dentro das espécies é o componente fundamental no processo da evolução dos organismos vivos uma vez que é responsável pela capacidade de adaptação das espécies às alterações ambientais (Young *et al.*, 1996; Geburek, 1997; Primack & Rodrigues, 2002; Reed & Frankham, 2003). Conceitualmente, a diversidade genética dentro das espécies pode ser definida como a variação individual dentro das populações refletindo os diferentes tipos que existem dentro destes grupos (Gregorius, 1987) e é um dos três níveis de diversidade biológica reconhecido pela União da Conservação Mundial (IUNC) como prioritárias para a conservação (Reed & Frankham, 2003).

Os níveis de diversidade genética detectados são considerados mais elevados nas espécies florestais arbóreas que em outros grupos de plantas (Hamrick *et al.*, 1992). O modelo de variação genética espacial dentro de populações de espécies tropicais varia muito de espécie para espécie, pois essas possuem variados mecanismos de dispersão, biologia reprodutiva, sistemas de polinização e cruzamento (Bawa, 1974; Loveless & Hamrick, 1984; Bawa *et al.*, 1985; Epperson, 1992; Campbell & Peart, 2001). Conceitualmente, a estrutura espacial é a distribuição dos genótipos ao longo de dois espaços dimensionais num

grupo de indivíduos e pode ser caracterizada pelas relações de localização físicas e genéticas ou genealógicas entre árvores individuais (Epperson, 1992). A dinâmica de movimentação gênica dentro e entre as populações pode ser determinada, para uma espécie em particular, através de estudos da estrutura genética das populações (Loveless & Hamrick, 1987). Outra característica importante das espécies florestais é a baixa densidade, (indivíduos por hectare). Em algumas espécies tropicais ocorre um ou menos de um indivíduo em período reprodutivo por hectare, o que tem sido já mostrado em vários inventários florísticos na Amazônia central (Amaral *et al.*, 2000; Oliveira, 2000).

Das várias espécies florestais com potencial de exploração comercial, sejam elas de madeira nobre ou as que produzem óleos essenciais na Amazônia Central, o Pau – rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) pertencente à família Lauraceae, é uma das mais importantes.

De acordo com Kubitzki & Renner (1982), o centro de diversidade do gênero *Aniba* parece ser as regiões das Guianas, Amazônia Central (região de Manaus) e num segundo plano as áreas próximas ao Rio Ucayalí e meados do Rio Madeira. A distribuição dessa espécie é ampla na região Neotropical podendo ser encontrada no Suriname, na Guiana Francesa, no Peru, Colômbia, Equador, Venezuela e Amazônia Brasileira (SUDAM, 1972). O Pau –rosa chega a alcançar até 40 m de altura e seu diâmetro chega a dois metros, ocorrendo com frequência em ambientes de terra firme, com uma frequência populacional muito baixa atualmente (menos de duas por hectare) (Mitja & Lescure, 2000). Seu comportamento ecológico indica ser uma espécie do grupo secundária tardia e, uma vez estabelecida, espécie clímax de dossel dominante (Mitja & Lescure, 2000). Uma de suas principais características é o aroma adocicado resultante da presença da essência de linalol em toda a planta (Araújo *et al.*, 1971), com variação nas concentrações deste álcool terpênico, sendo ligeiramente maior nas folhas (1,5%) que galhos finos e (1,3%) e lenho (1,0%) (Chaar, 2000).

Kubitzki & Kurtz (1984) afirmam que a espécie possui fecundação cruzada como mecanismo de maior ocorrência. Quanto a dispersão de sementes, as Lauraceae são caracterizadas pela síndrome de dispersão de sementes do tipo ornitocórica (via pássaros), sendo que já foi reportada uma remoção de até 50% de frutos, realizada por tucanos, em sistemas de plantio na Reserva Adolpho Ducke, em Manaus (Spironello *et al.*, 2003). De uma maneira geral espécies desta família (Lauraceae) participam em 80 % da dieta de alguns Psittacídeos (Ribeiro *et al.*, 1999). Do ponto de vista econômico é muito importante para a região Amazônica, podendo ser utilizada como madeira para serragem ou extração do óleo essencial. A principal utilização, na realidade, é como fonte do linalol, componente

principal do óleo essencial muito utilizado na indústria de perfumaria e de alto valor comercial, onde o mercado pode chegar a US\$ 1,8 bilhões de dólares por ano (Yahoo notícias, 2003). No Estado do Amazonas já chegou a ser o terceiro principal produto na balança comercial (SUDAM, 1972) sendo que atualmente, no mercado mundial, o preço de 100 mL de linalol varia entre 13 até 15 dólares (<http://chemacx.cambridgesoft.com/chemacx/chemacx>, dados coletados em 22/10/2003).

Por esse motivo, essa espécie tem sofrido nas últimas décadas com a exploração predatória, e corre ameaça de extinção, estando na “categoria em perigo” (IBAMA, 1992; Vial – Debas, 2000). Somente no Estado do Amazonas cerca de duas mil árvores são derrubadas anualmente (IBAMA, 2002 Apud Yahoo notícias, 2003).

A exploração remonta ao início do século passado, quando a técnica consistia unicamente em retirar todas as árvores com tamanho que justificasse sua derrubada. Esse tipo de exploração tem causado em outras espécies, muitos distúrbios - entre eles de ordem genética - onde se destaca: redução de indivíduos em período reprodutivo (Plumptre, 1995 Apud Jennings *et al.*, 2001) com redução na produção de sementes, aceleração da deriva genética, redução do fluxo gênico inter - populacional e aumento da frequência de autogamia e endocruzamento (Young *et al.*, 1996). Todos esses fatores contribuem para a redução da variabilidade genética em populações naturais (Hall *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996).

A variabilidade genética é consequência das variações que ocorrem nas seqüências de DNA e a forma direta de acessar essa variação é a análise molecular (Whaug, 1997; Ferreira, 2001). Com o refinamento das técnicas moleculares e a ampliação do conhecimento em genética molecular, tem sido aceito que as informações geradas e baseadas no polimorfismo do DNA, fornecem a melhor base para estimativa da diversidade genética (Whaug, 1997). Estes dados de diversidade ao nível molecular têm sido utilizados em trabalhos de avaliação genética de muitas espécies tropicais arbóreas (Geburek, 1997; Cardoso *et al.*, 1998; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Parker *et al.*, 1998; Bussel, 1999; Lowe *et al.*, 2001). Estes trabalhos auxiliam no entendimento dos impactos das práticas de manejo e a desenvolver um programa para a conservação de genes em ecossistemas florestais (Bawa *et al.*, 1990; Milligan, *et al.*, 1994; Haig, 1998; Petit, *et al.*, 1998; Changtroon *et al.*, 2001; Macdonald *et al.*, 2001; Zhang & Hewitt, 2003)

As técnicas moleculares avançaram sobretudo pelo surgimento da técnica de PCR. A técnica (do inglês *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase) consiste numa reação bioquímica em que uma pequena e específica região do genoma submetida a

ciclos consecutivos de síntese de DNA dupla fita é amplificada. Em outras palavras, a reação de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias dupla fita de um segmento específico de DNA, na presença da enzima *Taq* DNA polimerase (Mullis & Faloona, 1987).

Durante a reação de PCR ocorre o anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo de amplificação. Esses *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Baseada no PCR surge a técnica RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA) (Welsh & McClelland, 1990; Willians, *et al.*, 1990) que é na verdade uma variante da técnica de PCR, já que em vez de dois *primers* específicos utiliza-se apenas um de seqüência arbitrária e de menor tamanho.

A formação do marcador RAPD é baseada na probabilidade de que uma seqüência de DNA, homologa e curta, poderia ocorrer em diferentes pontos do DNA no genoma, dentro de uma distância que seria passível de amplificação por PCR. Como o resultado é a presença ou ausência de banda amplificada, o marcador RAPD torna-se dominante, o que gera a impossibilidade da detecção direta do heterozigoto (Waugh, 1997; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Em outras palavras, a presença de uma banda no gel identifica indivíduos homozigotos dominantes (AA) e heterozigotos (Aa), não permitindo a distinção entre eles. O homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda. Além disto, outra desvantagem é a baixa reprodutibilidade dos resultados de algumas bandas em ensaios posteriores (Yu & Pauls., 1992). Mesmo assim, esse marcador tem apresentado vantagens que podem ser aproveitadas se utilizado com critério (Lynch & Milligan, 1994; Geburek, 1997; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Bussel, 1999).

Análises com marcadores RAPD têm gerado muitas discussões a respeito de sua eficácia, sendo, inclusive hoje considerado um marcador pouco informativo. Muitas comparações têm sido feitas entre a utilidade do RAPD e outros tipos de marcadores para examinar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações (Schierenbeck *et al.*, 1997).

Para utilizar o marcador RAPD, então, de maneira eficiente, deve-se levar alguns fatores em consideração. Uma das formas de reduzir o efeito de dominância seria o uso de um número grande de *loci* (mais que trinta) e usando técnicas de análises de dados como a descrita por Lynch & Milligan (1994), onde a subestimativa dos alelos recessivos é



compensada (Excoffier *et al.*, 1992; Gillies *et al.*, 1999). É importante também, aumentar o rigor e os cuidados no momento da interpretação dos resultados. No caso da falta de reprodutibilidade, tem-se sugerido maiores cuidados no momento das leituras dos dados e a utilização de padrões ou critérios bem definidos no momento de observar as bandas (Weising *et al.*, 1995; Grattapaglia, 1997) e utilizadas em Rodrigues (2001).

No caso do Pau – rosa, pouco ou quase nada se sabe sobre a biologia reprodutiva, dinâmica ecológica e o padrão genético em populações naturais. Leite *et al.*, (1999) fizeram algumas recomendações para a conservação da variabilidade em regiões prioritárias da Amazônia, indicando a Reserva Florestal Adolpho Ducke, próxima a Manaus, como área prioritária e que permitiria a coleta de dados complementares. Além disso, apontaram a necessidade do conhecimento da variabilidade genética das populações remanescentes dessa região utilizando marcadores moleculares, avaliando assim o risco de extinção de suas populações naturais.

Os propósitos desse trabalho, portanto, foram:

- a) Definir as condições ideais para coleta, extração de DNA e análises de marcadores RAPD buscando o desenvolvimento de um critério de reprodutibilidade dos resultados.
- b) Estimar a diversidade genética em população natural de Pau - rosa, formada por plantas adultas e juvenis localizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke, na Amazônia Central, submetida a exploração e verificar a formação de demes na mesma área, e
- c) Analisar a distribuição da diversidade genética avaliando populações naturais que ocorrem em diferentes localidades do Baixo e Médio Amazonas.

# Capítulo 1

## **Aprimoramento das condições de PCR para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) e desenvolvimento de um critério de seleção de bandas RAPD baseado no grau de reprodutibilidade**

### **1.1.Introdução**

O Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) é uma espécie arbórea importante para a região amazônica por causa do alto valor do linalol, componente principal do óleo essencial extraído da planta e utilizado pela indústria de perfumaria (Vial-Debas, 2000). Ocorre em toda floresta Amazônica de terra firme, com frequência muito baixa atualmente (Mitja & Lescure, 2000), em função de décadas de exploração não controlada, durante as quais boa parte das populações naturais foi dizimada (Vial-Debas, 2000). Isto justificou sua inserção na lista de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 1992; Vial-Debas, 2000). A exploração sem planejamento pode contribuir para a redução da diversidade genética intra-específica (Hall *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996), assunto, apesar de relevante, pouquíssimo explorado para esta espécie.

As possibilidades de quantificação da diversidade genética, do fluxo gênico e a análise da estrutura genética de populações, tornaram-se mais concretas, nas últimas décadas (Geburek, 1997), a partir do desenvolvimento de técnicas que permitem a análises genéticas ao nível molecular (Almeida *et al.*, 2001). Dentre essas técnicas, destacam-se os marcadores moleculares baseados em amplificação de DNA via PCR (“polymerase chain reaction”), desenvolvida por Mullis & Faloona (1987). O surgimento de procedimentos apoiados em PCR, como o RAPD (“random amplified polymorphic DNA”), desenvolvido por Williams *et al.*, (1990), possibilitou o estudo de espécies sobre as quais se dispõe de pouca informação prévia, quando recursos financeiros e tempo, por exemplo, são fatores limitantes (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Além de ser relativamente fácil, rápida e simples, a aplicação de RAPD-PCR tem custo mais baixo que os demais marcadores e evidencia um bom número de *loci* polimórficos por reação, distribuídos aleatoriamente pelo genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Algumas das limitações da técnica, como o fato de serem marcadores dominantes, têm sido compensadas por metodologias alternativas de análise dos dados (Clark e Laningan, 1993; Lynch & Milligan, 1994; Bussel, 1999). Por outro lado, a reprodutibilidade

dos ensaios depende da espécie analisada, do executor dos experimentos, da qualidade dos reagentes e da estabilidade do termociclador (Yu & Pauls, 1992; Meunier & Grimont, 1993; Skroch & Nienhuis, 1995. Grattapaglia, 1997; Jones *et al.*, 1997). Assim, a otimização e padronização das condições de realização da PCR e a avaliação do grau de reprodutibilidade dos resultados são essenciais (Williams *et al.*, 1990; Yu & Pauls, 1992; Grattapaglia, 1997; Jones *et al.*, 1997; Nkongolo *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1998; Bussel, 1999; Ge *et al.*, 1999; Jordano & Godoy, 2000).

Os objetivos deste trabalho foram validar o protocolo para a coleta de material vegetal e selecionar protocolos para extração de DNA de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em quantidade e com qualidade adequada para a realização de PCR e desenvolver um critério para avaliar o grau de reprodutibilidade dos resultados, como tentativa de minimizar a interferência de artefatos da técnica RAPD-PCR na avaliação da diversidade genética de populações naturais, em fase de regeneração pós período de exploração, o que será tema de publicações subseqüentes.

## **1.2. Material e métodos**

### **Material vegetal**

Folhas coletadas de plantas adultas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) mantidas na Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus/AM) e de 130 plantas, matrizes (adultas, em idade reprodutiva) e regenerantes (juvenis), de população natural da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM) foram coletadas em tubos de polietileno com grânulos de sílica gel (Chase & Hills, 1991) e armazenadas em “freezer” a -20 °C, no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus/AM), até o momento da utilização. As amostras coletadas na Reserva Ducke permaneceram em temperatura ambiente, nos tubos com sílica, por cerca de 10 dias.

### **Extração e quantificação de ácidos nucléicos**

O material vegetal foi submetido à extração dos ácidos nucléicos, segundo testes iniciais realizados por Quirsen *et al.*, (2003), utilizando três diferentes protocolos, que foram: CTAB (Doyle & Doyle, 1987); Edwards *et al.*, (1991) e CTAB, modificado por Khanuja *et al.* (1999). A extração dos ácidos nucléicos foi precedida da maceração, em nitrogênio líquido, dos tecidos das folhas armazenadas. As soluções de ácidos nucléicos, contendo o DNA genômico, foram armazenadas a -20 °C, em TE (Tris-EDTA). Os protocolos foram comparados segundo os critérios: a) integridade do DNA obtido, avaliada por observação das imagens dos géis de agarose empregados para a eletroforese; b) relação entre a absorvância lida nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As leituras de absorvância foram realizadas em aparelho “GeneQuant pro RNA/DNA Calculator” (Amersham Pharmacia Biotech).

### **Aprimoramento das condições da PCR**

A eletroforese foi realizada em géis de agarose 1,5 %, em TBE 1 X, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml), a cerca de 5 V/cm de gel, 200 a 250 mA, por 3 horas de corrida. O registro dos resultados foi realizado utilizando o sistema de foto-documentação Kodak “Zoom Digital Camera” e o aplicativo acessório (“Kodak Digital Science DC120 Kit

Gel Documentation Accessory Kit and 1D Image Analysis Software” - manual de instruções (Kodak, 1999). As matrizes de dados binários foram construídas segundo as imagens impressas a partir dos arquivos de imagens no formato Kodak. As soluções de ácidos nucleicos foram diluídas para a concentração de 10 ng/μL em água destilada autoclavada e armazenadas a -20 °C. Foram testadas concentrações finais de alguns reagentes utilizados nas reações de PCR (com exceção dos 50 mM de KCl e de 20 mM de Tris-HCl, mantidos constantes) e a necessidade da inclusão de BSA nas reações. Os testes realizados para a quantidade de **DNA** de Pau-rosa por reação incluíram 0, 15, 30, 45, 60 ng; para o número de unidades de **Taq** DNA polimerase por reação foram testadas 0; 1,25; 2,50; 3,75; 5,00 unidades. As concentrações de **MgCl<sub>2</sub>**: 0; 0,75; 1,50; 2,25 e 3,00 mM; de “**primer**”: 0, 125, 250, 375, 500 nM e dos **dNTPs**: 0, 50, 100, 150, 200 μM de cada tipo foram testadas. As reações tiveram volume final de 25 μL. Os testes foram realizados utilizando o "primer" de seqüência 5’-ACG GCG TAT G-3’ e DNA extraído de uma planta. O termociclador (Perkim Elmer Gene Amp PCR System 2400) foi programado para 92 °C por 1 min; 35 x (92 °C por 1 min; 30 °C por 2 min e 72 °C por 1 min); 72 °C por 5 min; 4 °C indefinidamente. Variou-se a temperatura de anelamento em 30 e 35 °C.

### **Avaliação do grau de polimorfismo RAPD em Pau-rosa**

Avaliou-se a quantidade total de bandas e a quantidade de bandas polimórficas produzidas, para esta espécie, por 20 “primers” decâmeros de seqüência aleatória e conteúdo de guanina e citosina entre 60 e 70%, em teste realizado com DNA extraído de folhas de quatro plantas, escolhidas arbitrariamente.

### **Avaliação do grau de reprodutibilidade das bandas RAPD**

Avaliou-se o grau de reprodutibilidade das bandas produzidas por 11 “primers” utilizados para amplificar o DNA de grupos com número variável de oito a 20 plantas (total de 127 plantas) e em seguida, estes grupos foram padronizados em oito plantas de Pau-rosa (total de 88 plantas por tratamento, vide definição de tratamento a seguir), mantendo-se todas as plantas dos grupos em que havia oito plantas e escolhendo aleatoriamente oito plantas dentro dos grupos em que este número era maior. As reações de PCR foram realizadas em duas ocasiões diferentes, observando condições idênticas, inclusive o executor dos experimentos. Os resultados obtidos para testes com grupos contendo número

variável (de oito a 20) de plantas foram comparados com os resultados obtidos para testes realizados com grupos padronizados de oito plantas.

### **Desenvolvimento do critério de seleção de bandas com base na reprodutibilidade**

Este processo envolveu a análise, banda a banda, do padrão RAPD produzido com cada “primer”, para cada planta. Então, para cada planta, foi verificada a presença ou ausência de cada banda, na primeira ocasião em que o experimento foi realizado. Este padrão foi comparado com aquele produzido para a mesma planta, na segunda ocasião. Tratando-se de experimentos realizados com grupos de 20 plantas, por exemplo, o padrão de cada banda foi, portanto, testado para a ocorrência de coincidências (banda presente na primeira e na segunda ocasiões ou ausente na primeira e na segunda ocasiões em que uma mesma planta foi avaliada) por 20 vezes. Neste conjunto de 20 chances de coincidência, a porcentagem de ocorrência de coincidências poderia variar, de banda para banda, desde 0 em 20 (grau de reprodutibilidade = 0) até 20 coincidências em 20 chances (grau de reprodutibilidade = 100%).

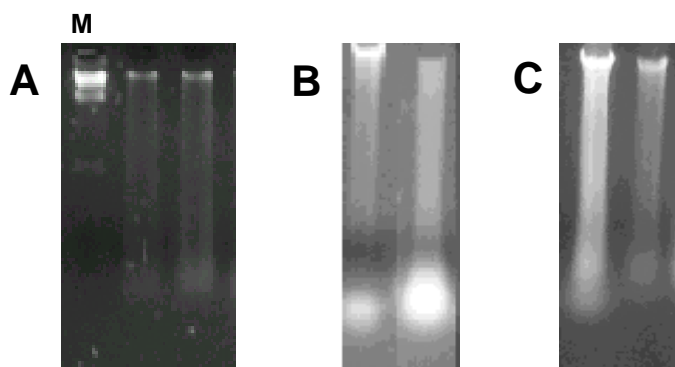
As bandas observadas nos géis foram transformadas numa matriz de dados binários onde a presença da banda é igual a um (1) e a ausência zero (0). Os índices de auto-similaridade (fórmula de Jaccard), ou seja, os índices de similaridade entre os padrões RAPD obtidos para a mesma planta, em duas ocasiões (Pérez *et al.*,1998), foram, calculados, conforme os critérios, que considerou-se ser também os tratamentos: **tratamento 1** - nenhum critério de reprodutibilidade foi aplicado, ou seja, todas as bandas geradas por RAPD-PCR foram admitidas para o cálculo dos índices de auto-similaridade de Jaccard; **tratamento 2** - apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 90% foram admitidas para o cálculo dos índices de auto-similaridade de Jaccard; **tratamento 3** - apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 80% foram admitidas para o cálculo dos índices de auto-similaridade de Jaccard e **tratamento 4** - apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 70% foram admitidas para o cálculo dos índices de auto-similaridade de Jaccard. O número de índices de auto-similaridade iguais a 1 foi contado, “primer” por “primer”, e as médias encontradas para os 11 “primers” utilizados, foram calculadas, para cada tratamento. Para testar os contrastes entre estas médias aplicou-se o teste de Tukey. Os índices de auto-similaridade foram calculados com os arquivos de dados

binários, utilizando o aplicativo GENES (Universidade Federal de Viçosa - Cruz, 1997). ANOVA e teste de médias foram realizados utilizando o aplicativo SYSTAT, versão 9.

Matrizes de similaridade (índice de Jaccard) foram geradas com parte dos dados (grupos padronizados com oito plantas) obtidos nas duas ocasiões em que os experimentos de PCR foram realizados. Os dados foram submetidos aos quatro tratamentos descritos acima e novas matrizes foram geradas (oito no total, sendo duas matrizes para cada tratamento, cada uma gerada em uma das ocasiões em que os experimentos de amplificação foram realizados). O teste de correlação entre as duas matrizes de similaridade geradas com dados submetidos a cada um dos tratamentos foi realizado através da rotina “MXCOMPG” do aplicativo NTSYS - PC, versão 1.04 (Rohlf, 1990) gerando-se valores de correlação com respectivas probabilidades utilizando-se a comparação de Mantel (1967). Matrizes de similaridade geradas para grupos formados por número variável (oito a 20) de plantas não foram submetidas à análise de correlação.

### 1.3. Resultados e discussão

Três protocolos para a extração de ácidos nucleicos de folhas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) foram testados e os testes permitiram, também, validar o método utilizado para a coleta e preservação do material vegetal. As folhas, que foram coletadas em tubos de polietileno com grânulos de sílica, tanto na Embrapa Amazônia Ocidental quanto na Reserva Florestal Adolpho Ducke, forneceram DNA em quantidade e com qualidade suficientes para a realização dos experimentos de RAPD-PCR, quando o protocolo desenvolvido por Edwards *et al.*, (1991) foi utilizado para a extração (Figura 1A). Folhas coletadas na Reserva Ducke ficaram, por cerca de 10 dias, em temperatura ambiente antes de serem armazenadas a -20 °C, no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental e, ainda assim, os ácidos nucleicos foram suficientemente preservados de degradação. Foram testados protocolos de extração desenvolvidos por Edwards *et al.* (1991), Khanuja *et al.*, (1999) e Doyle & Doyle (1987). A Figura 1 apresenta os géis de eletroforese em agarose das soluções de ácidos nucleicos (DNA + RNA) obtidas pela aplicação dos três protocolos. O DNA extraído conforme o protocolo de Edwards *et al.* (1991) foi considerado de melhor qualidade do que a que se verificou pela aplicação do método de Khanuja *et al.*, (1999) (Figura 1B).



**Figura 1.** Resultado de eletroforese, em gel de agarose a 1,0%, de ácidos nucleicos extraídos de folhas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) coletadas em tubos de polietileno com grânulos de sílica e armazenadas em “freezer” a -20 °C, até o momento da utilização. **A** - Extrações conforme Edwards *et al.* (1991). **B** - Extrações conforme Khanuja *et al.* (1999). **C** - Extrações conforme Doyle & Doyle (1987). Foram aplicados 8 µL da solução de ácidos nucleicos obtida ao final das preparações em cada poço do gel. **M** -  $\lambda$ /HindIII 1,0 µg.

Os resultados obtidos quando foram utilizados os métodos desenvolvidos por Khanuja *et al.*, (1999) e por Doyle & Doyle (1987) (Figuras 1B e 1C) não apresentaram a



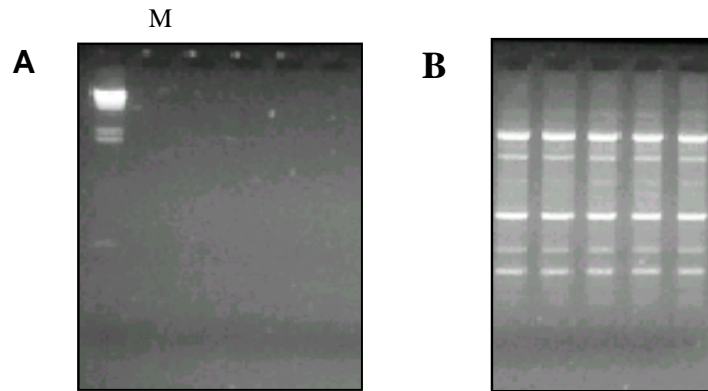
homogeneidade esperada, para processamento de material vegetal coletado e armazenado de maneira padronizada e algumas das amostras tratadas conforme o recomendado por Doyle & Doyle (1987) sofreram perda de qualidade após a extração, ao longo do tempo, ainda que mantidas a -20 °C. Este último efeito não foi verificado para DNA obtido via aplicação dos outros dois protocolos, para a extração de DNA das mesmas plantas. Outra vantagem do protocolo Edwards é também a maior rapidez e simplicidade de extração em laboratório se considerarmos grande número de amostras.

A presença de proteínas e/ou substâncias fenólicas nas soluções de ácidos nucleicos, o que pode influenciar o resultado das reações de PCR, variou de amostra para amostra, sendo 1,68 a média da relação entre os picos de absorvância em 260 e 280 nm. Este valor é considerado como indicador de qualidade boa, ou seja, de presença de uma quantidade aceitável daqueles contaminantes nas soluções de DNA + RNA (Romano, 1998; Amersham Pharmacia Biotech).

A concentração de ácidos nucleicos nas soluções obtidas pela aplicação do método de extração de Edwards *et al.* (1991), de amostras de folhas de 130 plantas de Pau-rosa, oriundas da Reserva Ducke, variou de 65 a 1.245 ng/μL, para cada 700 a 800 mg de folha macerados

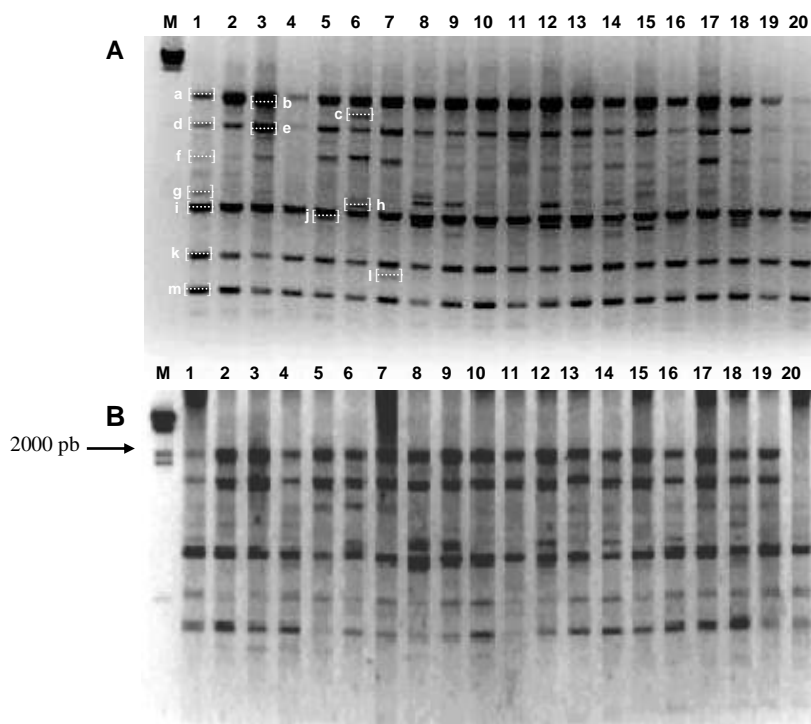
Os resultados dos testes de aprimoramento das condições da PCR para produção de RAPD para Pau-rosa indicaram que o emprego de 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, lote QBJB11d) por reação; entre 2,25 e 3,00 mM de cloreto de magnésio; pelo menos 375 nM de “primer” decâmico e acima de 100 μM de cada dNTP foram suficientes para gerar amplificação. As melhores amplificações foram obtidas quando a temperatura de anelamento foi de 35° C. Estes resultados são semelhantes aos já testados e definidos para *Persea americana* Mill. outra Lauraceae, exceto para a quantidade de Taq que foi de 1,5 U para este trabalho (Tsu-Liang *et al.*, 2003). Os testes realizados para a quantidade de ácidos nucleicos incluídos não produziram resultados diferentes para 15, 30, 45 ou 60 ng por reação. A inclusão de 0,1% de BSA mostrou-se essencial para as amplificações (Figura 2).

Vinte “primers” foram avaliados quanto ao número de bandas RAPD geradas e ao polimorfismo verificado para estas bandas. Neste teste, o número médio de bandas produzidas por planta foi de 8,4, sendo 2,9 a média de bandas polimórficas.



**Figura 2.** Resultados de eletroforese de ensaios RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em que foi testada a necessidade da inclusão de BSA nas reações de PCR. **A** - reações em que não foi adicionada BSA. **B** - reações em que foi adicionada BSA, na concentração de 0,1%. **M** -  $\lambda$ /HindIII. A seqüência do “primer” utilizado para os experimentos foi 5'-ACG GCG TAT G-3'.

O número médio de bandas produzidas por RAPD parece ser independente do tamanho do genoma e em organismos tão diferentes quanto cianobactérias e a soja, observou-se um número médio de cinco bandas por reação (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Então, RAPD-PCR pode ser considerada uma boa ferramenta para acessar a estrutura genética também de populações de Pau-rosa, já que nas condições utilizadas para a realização das PCRs aqui relatadas a média de bandas observadas por planta foi superior a cinco e ocorreu polimorfismo. O tamanho dos fragmentos amplificados foi definido pela ferramenta “Lane and Bands Analysis” do aplicativo Kodak “1D Image Analysis” e variou de 185 a 2.300 pb.



**Figura 3.** Resultados de eletroforese de ensaios RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em que foi testada, banda a banda, a reprodutibilidade dos padrões. O DNA de 20 plantas foi amplificado, utilizando as mesmas condições, em ocasiões diferentes. **A** e **B** são os resultados obtidos nestas duas ocasiões. Os números identificam os indivíduos e indicam o padrão de bandas referente a cada um deles. As letras minúsculas de **a** até **m** identificam bandas que compõem padrões RAPD-PCR avaliadas neste experimento. **M** -  $\lambda$ /HindIII. O grau de reprodutibilidade para cada banda desta Figura 3 está indicado na Tabela 1. Estão apresentados os negativos das fotos captadas pelo sistema de documentação Kodak “Digital Science DC120 Zoom Camera Kit, Gel documentation Accessory Kit and 1D Image Analysis Software”.

A reprodutibilidade das bandas produzidas por 11 daqueles 20 “primers” foi testada e a variação no grau de reprodutibilidade foi utilizada para o desenvolvimento de um critério de seleção de bandas, que poderá ser utilizado para análises genéticas de população natural de Pau - rosa, encontrada na Reserva Florestal Adolpho Ducke, objeto de próximas publicações.

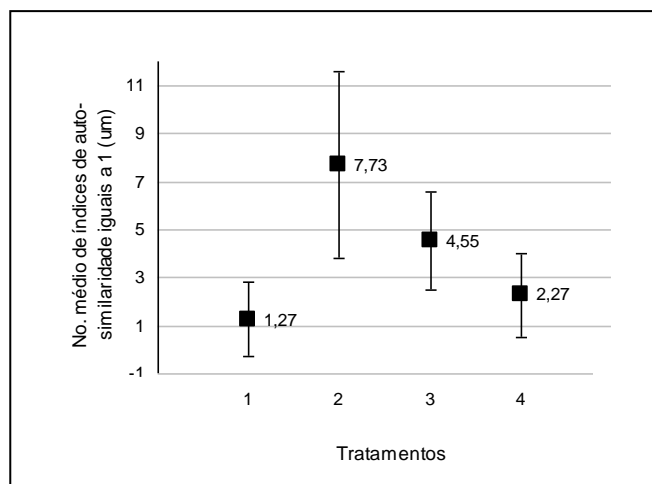
**Tabela 1.** Freqüência e o grau de reprodutibilidade de bandas geradas por RAPD – PCR em um “primer”

bandas	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
no. de vezes em que ocorre coincidência do padrão da banda em ocasiões (A e B na Figura 3) diferentes	20	19	14	20	9	17	16	15	20	13	20	20	20
grau de reprodutibilidade: percentagem de vezes em que ocorre coincidência do padrão da banda em 20 chances	100	95	70	100	45	85	80	75	100	65	100	100	100

O padrão das bandas foi reprodutível 0 a 100% das vezes em que foi testado. No exemplo da Figura 3 e da Tabela 1, há variação do grau de reprodutibilidade entre 45 e 100%. A influência de bandas com graus de reprodutibilidade entre 70 e 90% no cálculo de índices de similaridade de Jaccard foi verificada através da comparação dos padrões produzidos para um mesmo grupo de plantas, em duas ocasiões.

O número médio de índices de auto – similaridade igual a um (1) variou em função da admissão ou não, para o cálculo, de bandas com graus de reprodutibilidade entre 70 e 90%. Ocorreu diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre os tratamentos definidos por: **1**- admissão, para o cálculo dos índices de auto-similaridade utilizando a fórmula de Jaccard, de todas as bandas produzidas; **2** - admissão apenas das bandas com grau de reprodutibilidade igual ou maior que 90%; **3** - admissão apenas das bandas com grau de reprodutibilidade igual ou maior que 80%; e **4** - admissão apenas das bandas com grau de reprodutibilidade igual ou maior que 70%.

Houve diferença significativa entre o número médio de índices de auto-similaridade iguais a “um”, detectada pelo teste de Tukey, com probabilidades  $\leq 5,8\%$ , para os contrastes entre o tratamento 2 e qualquer outro (Figura 4), independente do número de plantas comparadas por grupo. A diferença entre o tratamento 3 e o 4 apresentou-se mais sutil e dependente do número de plantas incluídas em cada grupo. Os testes de médias realizados para grupos formados por número variável de plantas (oito a 20) indicaram que a diferença entre estes dois tratamentos não foi estatisticamente significativa ( $P > 10,0\%$  - Figura 4).



**Figura 4** - Número médio de índices de auto-similaridade iguais a 1 (um) e desvio do número médio, para tratamentos aplicados a padrões de bandas RAPD, obtidos para 11 grupos (cada um submetido à PCR com um “primer” diferente), cada grupo contendo 8 a 20 plantas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Os índices foram calculados aplicando a fórmula de Jaccard aos padrões produzidos para as mesmas plantas em ocasiões diferentes. **Tratamento 1:** nenhum critério de reprodutibilidade foi aplicado, ou seja, todas as bandas geradas por RAPD-PCR foram admitidas para o cálculo dos índices; **tratamento 2:** apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 90% foram admitidas para o cálculo dos índices; **tratamento 3:** apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 80% foram admitidas para o cálculo dos índices e **tratamento 4:** apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 70% foram admitidas para o cálculo dos índices.

Já, quando a diferença entre as médias encontradas para grupos padronizados, com oito plantas cada, foi testada, a significância do contraste entre os tratamentos 3 e 4 foi de 4,2%. Então, pode-se dizer que, pelas análises até aqui realizadas, ficou demonstrado que somente a aplicação do critério de eliminação das bandas RAPD que apresentaram grau de reprodutibilidade menor que 90%, antes de realizar o cálculo de índices de similaridade de Jaccard, influenciou significativamente estes cálculos, de maneira independente do número de plantas comparadas. A eficiência da eliminação de bandas com grau de reprodutibilidade menor que 80% antes do cálculo de índices de similaridade mostrou-se dependente do número de plantas incluídas em cada grupo testado e só foi detectada quando o mesmo número de plantas foi comparado por grupo. A eliminação de bandas com reprodutibilidade menor que 70% (tratamento 4) não produziu efeito diferente, estatisticamente significativo, da não aplicação de critério de seleção de bandas, isto é, utilizar todas as bandas (tratamento 1).

A aplicação do teste de correlação entre matrizes (Teste de Mantel) foi interessante porque permitiu avaliar a eficiência dos critérios de seleção de bandas também sobre índices

de similaridade obtidos para plantas diferentes, ou seja, para todos os componentes de cada grupo de oito e não apenas sobre índices de auto-similaridade calculados para oito delas. O coeficiente de correlação entre matrizes geradas sem a eliminação de bandas (tratamento 1) foi de 0,21 ( $P > 10,0\%$ ), matrizes geradas por admissão de bandas com grau de reprodutibilidade igual ou superior a 90% (tratamento 2) foram correlacionadas com coeficiente  $r = 0,92$  (correlação significativa com  $P < 1,0\%$ ), a comparação entre matrizes geradas por admissão de bandas com grau de reprodutibilidade igual ou superior a 80% (tratamento 3) gerou coeficiente 0,52 ( $P = 5,0\%$ ) e a comparação de matrizes geradas por admissão de bandas com grau de reprodutibilidade igual ou superior a 70% (tratamento 4) gerou coeficiente 0,21 ( $P > 10,0\%$ ), como o que foi verificado para o tratamento 1. Uma vez que estes resultados, para grupos padronizados com oito plantas, corroboraram o que já havia sido discutido, a análise de correlação entre matrizes distribuiu melhor o peso das conclusões, não mais apoiadas somente sobre a coincidência dos padrões de bandas RAPD produzidos para oito plantas por grupo, em ocasiões diferentes, ou seja sobre índices de auto-similaridade.

## 1.4. Conclusões

A geração de bandas RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) é possível quando o material vegetal é coletado em tubos de polietileno com grânulos de sílica gel, armazenado, até 10 dias depois da coleta, a -20 °C e o DNA é extraído utilizando tampão de extração contendo SDS com o protocolo Edwards *et al.*, (1991).

A aplicação de um critério de seleção de bandas RAPD, em que foram eliminadas aquelas com grau de reprodutibilidade menor que 90%, influenciou significativamente o valor calculado para os índices de similaridade de Jaccard. A reprodutibilidade dos ensaios RAPD para Pau - rosa foi estatisticamente satisfatória no tratamento 2 (utilização de bandas com reprodutibilidade acima de 90%).

## Capítulo 2

### **Análise da diversidade genética para duas gerações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) da Reserva Ducke (Manaus/AM) revela indícios de endemização**

#### **2.1.Introdução**

O Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) é uma árvore pertencente à família das Lauraceae que pode chegar a 40 metros de altura, sendo por isso considerada uma planta de dossel. O diâmetro à altura do peito chega até dois metros (Mitja & Lescure, 2000). Uma de suas principais características é o aroma adocicado resultante da presença da essência de linalol em toda a planta (Araújo *et al.*, 1971).

A distribuição dessa espécie é ampla na região Neotropical podendo ser encontrada no Suriname, na Guiana Francesa, no Peru, Colômbia, Equador, Venezuela e Amazônia brasileira (SUDAM, 1972). No Brasil, seu habitat ótimo é o alto e médio Amazonas e ocorre mais abundantemente no Amapá e na fronteira com Guiana Francesa (Costa *et al.*, 1995). Ocorre com maior frequência em ambientes de terras firmes e altas, principalmente em matas pluviais não inundáveis, ao longo das margens dos rios (Santana, 2000). A frequência de árvores por hectare é bastante reduzida (SUDAM, 1972; Sampaio, 2000).

Evidências demonstram que, por se tratar de uma espécie heliófita, os regenerantes do Pau – rosa crescem quando existe uma clareira na mata, principalmente, onde há uma mortalidade acentuada das árvores vizinhas por senilidade, derrubadas pelo vento ou atacadas por doenças (SUDAM, 1972; Mitja & Lescure, 2000). Por ausência de clareiras, associada à alta predação de sementes (Spironello *et al.*, 2003) e à irregularidade da floração e frutificação (Magalhães & Alencar, 1979; Kubitzki & Kurtz, 1984) o que geralmente ocorre na mata é que o número de regenerantes (plantas em estado juvenil) é bastante reduzido. O seu comportamento ecológico indica ser uma espécie do grupo secundária tardia que, uma vez estabelecida, torna-se espécie clímax de dossel dominante (Mitja & Lescure, 2000). A dispersão de frutos e sementes se faz basicamente por meio da ação de pássaros, como tucanos, conforme observaram Spironello *et al.* (2003), em plantios desta espécie.



As plantas de Pau-rosa apresentam dicogamia sincrônica e protoginia, o que favorece muito a alogamia (Kubitzki & Kurtz, 1984) mas a auto-fecundação é possível (Leite, *et al.*, 1999). Informações à cerca de polinizadores foram registradas por Kubitzki & Kurtz (1984), que creditam a função de polinização das plantas de Pau-rosa aos Meliponinae, sobretudo pela compatibilidade de seu tamanho - de 2 a 3 mm de comprimento - com o da flor e por Spironello *et al.*, (2003) com a observação de visitação de pequenos tripses em árvores de plantio na Reserva Ducke.

O linalol, utilizado na indústria de perfumaria, possui alto valor de mercado (SUDAM, 1972). O preço de catálogo divulgado através da internet por fornecedores internacionais varia de US\$13,40 a US\$15,75 para 100 ml de “linalool” com pureza de 97%. Na mesma página eletrônica 1 g de “DL-linalool” puro, testado por cromatografia a gás foi cotado a US\$118,00 (<http://chemacx.cambridgesoft.com/chemacx/chemacx>, dados coletados em 22/10/2003).

Técnicas predatórias de manejo do Pau-rosa, para extração de linalol, têm sido empregadas desde o início do século passado, com retirada de toda a árvore do local, sem deixar possibilidade de brotamento, já que a essência é encontrada em toda a planta (Araújo *et al.*, 1971). Em função disto, atualmente, o acesso às áreas com populações remanescentes de Pau – rosa é bastante difícil (SUDAM, 1972) e a espécie é alocada na "categoria em perigo" de extinção (IBAMA, 1992; Vial - Debas, 2000).

Próxima à cidade de Manaus, encontra-se, na área da Reserva Florestal Adolpho Ducke, uma população remanescente de Pau-rosa bastante representativa, de acordo com dados de levantamentos florísticos e inventários realizados em anos anteriores (Ribeiro *et al.*, 1999; Spironello *et al.*, 2003). Do histórico daquela área, consta a ocorrência de intensa exploração de Pau – rosa por décadas no século passado, para servir como matéria prima para as muitas usinas de beneficiamento de linalol existentes na cidade de Manaus (SUDAM, 1972; Sampaio, comunicação pessoal, 2003). Práticas deste tipo geraram impactos negativos importantes nas características da diversidade genética de populações de outras espécies manejadas, o que há muito tempo vem sendo documentado (Savolainen & Karkkainen, 1992; Murawski *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1996; Geburek, 1997; Putz *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Lowe, *et al.*, 2001).

Os objetivos deste trabalho foram utilizar marcadores moleculares RAPD para: (1) investigar a ocorrência de alterações de diversidade genética entre gerações de plantas de Pau – rosa, protegidas na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM), após período de exploração não planejada; (2) verificar a ocorrência de demes de Pau-rosa na mesma área.

## **2.2. Material e métodos**

### **Local de estudo**

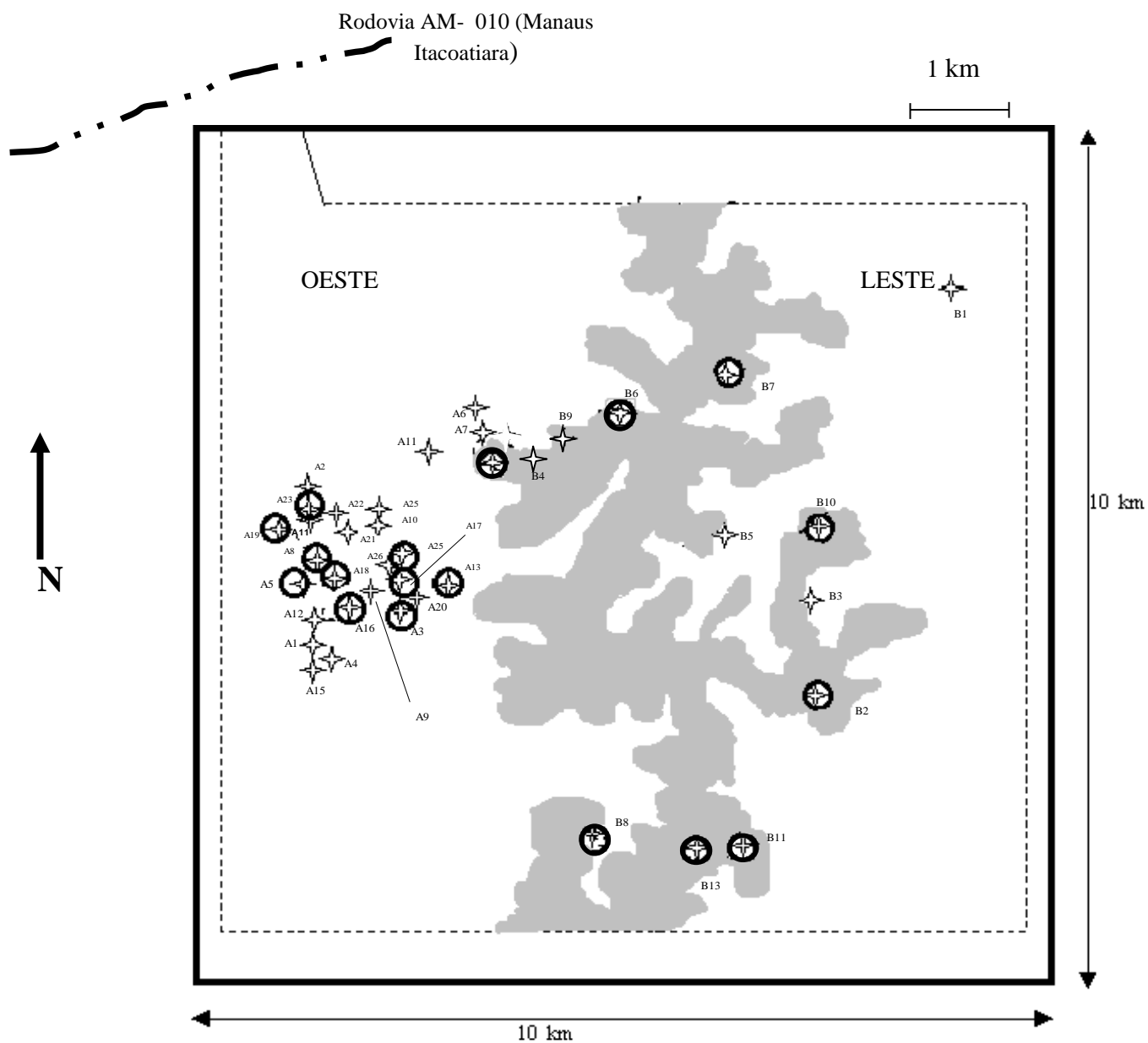
A população amostrada está localizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke, área de propriedade do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) desde 1963, que fica nas proximidades (a 26 km do Centro) da cidade de Manaus, na Rodovia AM – 010 (2° 37' S 60° 11' O). A Reserva tem uma área de 100 km<sup>2</sup> (10 x 10 km). Ribeiro *et al.*, (1999) registraram que o relevo da Reserva é ondulado, com uma variação altitudinal de 80 m entre platôs e partes mais baixas, o que leva à divisão da área em duas partes distintas, separadas por um platô central (Figura 1).



### **Coleta de material vegetal**

Plantas adultas de Pau – rosa foram localizadas e identificadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke. Estimativas das distâncias entre as plantas foram realizadas para traçar um mapa de distribuição das adultas. As plantas foram arranjadas em dois grupos, denominados “lado Oeste”, formado por plantas distribuídas sobre um baixio, e “lado Leste”, formado por plantas distribuídas principalmente sobre o platô central da Reserva (Figura 1).

Folhas jovens de 39 plantas adultas foram coletadas, sendo que, destas, 18 tinham de uma até nove plantas em fase juvenil (regenerantes) embaixo de sua copa, dentro de um raio de aproximadamente de 15 metros. Amostras de folhas foram coletadas de 60 plantas regenerantes. Do lado Oeste da Reserva, foram coletadas folhas de 26 plantas adultas e 25 regenerantes. Do lado Leste, de 13 adultas e 35 regenerantes (Figura 1).

As folhas coletadas foram acondicionadas em tubos plásticos devidamente identificados, contendo sílica gel (Chase & Hills, 1991) e assim foram transportadas até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, onde foram em preservadas em “freezer”, à temperatura de –20 °C.



**Figura 1.** Distribuição de plantas de Pau – rosa (*Aniba roseodora*, Ducke) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, que fica a 26 km do centro de Manaus – AM. A área hachurada na reserva equivale a um platô central de maior cota que divide a área. O símbolo  são as plantas adultas que apresentaram plantas juvenis sob a copa ;  são as demais plantas adultas. Plantas marcadas com a letra “A” são componentes do grupo Oeste e “B” componentes do grupo Leste.

## **Extração e quantificação de DNA**

O tampão de extração de DNA continha 250 mM de NaCl; 200 mM de Tris HCl; 25 mM de EDTA (ácido etileno diamina tetracético) e 0,5% de SDS (dodecil sulfato de sódio) (Edwards *et al.*, 1991). O tampão de estoque de DNA continha 10 mM de Tris HCl e 1 mM de EDTA (TE) e foi previamente autoclavado, por 30 minutos. Todas as folhas foram lavadas antes de serem pesadas. Para cada extração, tomou-se uma amostra (de plantas adultas e regenerantes) de 150 a 200 mg de folhas para serem macerados em nitrogênio líquido. As soluções de DNA em TE foram armazenadas em “freezer” a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria em aparelho GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech). Para facilitar o preparo das reações de amplificação, as soluções de DNA foram diluídas para a concentração de  $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ , em água destilada autoclavada, e também mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **Reações RAPD - PCR**

Todas as reações foram realizadas conforme os procedimentos de otimização e padronização descritos no Capítulo 1 deste trabalho. O termociclador utilizado foi o Perkin Elmer Amp PCR System 2400. Foram utilizados nove “primers” decâmeros, de sequência arbitrária, para as análises de diversidade genética em populações de Pau-rosa da Reserva Florestal Adolpho Ducke. Reações controle foram realizadas com todos os “primers”. A obtenção das imagens e análises dos dados estão descritos no Capítulo 1.

## **Análises genéticas e estatísticas**

### **Verificação da ocorrência de alterações de diversidade genética entre gerações**

Foram calculados os índices de diversidade de Shannon (Lewontin, 1972; King & Shaal, 1989) número de alelos totais e efetivos por *locus*, número de *locus* polimórficos e a porcentagem de *locus* polimórficos para plantas adultas e para plantas regenerantes. Avaliou-se o fluxo gênico, por estimativa do número médio de migrantes por geração ( $N_m$ ) (Slatkin & Barton, 1989) e calculou-se o índice de identidade genética entre grupos (adultas e regenerantes; Lado Oeste e Leste) (Nei, 1972). Todas estas análises foram realizadas utilizando o “software” POPGENE - versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

Estimou-se, ainda, a heterozigosidade média para as populações, onde assumiu-se que há ausência do alelo recessivo de acordo com Weir (1996) utilizando o critério de Nei (1978) no *software* TFPGA 1.3 (Miller, 1997).

### **Verificação da ocorrência de demes de Pau-rosa na área da Reserva Ducke**

Foram calculados os índices de diversidade de Shannon (Lewontin, 1972; King & Shaal, 1989), o número de alelos totais e efetivos por *locus*, número de *locus* polimórficos e a percentagem de *locus* polimórficos para plantas arranjadas nos dois grupos, denominados “lado Oeste” e “lado Leste da Reserva Ducke. O “software” utilizado foi o POPGENE - versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

A correlação entre matrizes de distância geográfica (distância recíprocas de acordo com Manly, (1997) e Peterson *et al.*, 2003) e de distância genética (índice de dissimilaridade de Jaccard) entre plantas adultas foi realizada utilizando o teste de Mantel (1967), do “software” TFPGA (Miller, 1997) com 1000 permutações, considerando as correções sugeridas por Lynch & Milligans (1994) para análises de marcadores dominantes.

Avaliou-se a existência de diferenças significativas nas frequências das bandas para cada lado por meio do “Exact test” (Raymond & Rousset, 1995). As bandas que apresentaram valores de frequência mais baixa, foram identificadas e sua distribuição foi avaliada individualmente entre plantas adultas e nos regenerantes dentro de cada grupo.

Avaliou-se o fluxo gênico, por estimativa do número médio de migrantes por geração ( $Nm$ ) (Slatkin & Barton, 1989) entre os grupos de plantas de Oeste e Leste e entre adultas e regenerantes de cada grupo e calculou-se o índice de identidade genética entre grupos (Nei, 1972), utilizando o “software” POPGENE - versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

Para avaliar o padrão de agrupamento entre as adultas e regenerantes, foram feitas duas análises: 1- o dendrograma utilizando o a distância de Jaccard e o agrupamento Ligação média dentro do Grupo por meio do *software* GENES (Cruz, 1997) onde levou-se em consideração a necessidade de verificar a relação entre os indivíduos dentro de cada grupo e 2- o padrão de relação bidimensional com a Análises de Componentes Principais (PCA), na rotina MXPLOT no *software* NTSYS - pc v. 1.04 (Rohlf, 1990).

## 2.3.Resultados

O número de fragmentos amplificados ou bandas obtidas nas reações de RAPD – PCR, assim como o polimorfismo gerado por cada “primer” utilizado para amplificar o DNA das plantas de Pau-rosa da Reserva Ducke estão detalhados na Tabela 1. O número médio de bandas por “primer” foi de 11,9. O tamanho das bandas variou de 185 a 2.300 pb. Foram geradas 107 bandas, sendo que destas, 90 foram polimórficas, o que equivale a 84,11% de polimorfismo. Número variável de bandas polimórficas foi gerado por “primers” diferentes, sendo o menor valor 60% e o maior 100% de fragmentos gerados apresentando polimorfismo (Tabela 1).

**Tabela 1** . Sequência dos “Primers” utilizados para gerar fragmentos RAPD para plantas de Pau-rosa da Reserva Florestal Adolpho Ducke, com indicação do número de bandas totais e polimórficas, percentagem de polimorfismo e a o tamanho da maior e menor bandas geradas por cada “primer”.

“primer”	sequência	nº de bandas			variação em pb
		totais	polimórficas	%	
P4	´5-AAGTCCGCTC-3´	14	12	85	470 –1570
P6	´5-CCACGGGAAG-3´	8	5	63	410 - 980
P10	´5-TCAGAGCGCC-3´	10	9	90	570 –1000
P16	´5-AAGACCCCTG-3´	13	9	69	460 -1780
P19	´5-CTTCACCCGA-3´	10	9	60	465 -1650
P40	´5-AGCGCCATTG-3´	11	9	82	430 -1470
P48	´5-GGCACGCGTT-3´	13	13	100	185 -1340
P50	´5-ACGGCGTATG-3´	11	11	100	460 -2300
P51	´5-CATCCGTGCT-3´	17	13	75	300 -1550
Total		107	90	84,11	

Os índices que indicaram a diversidade genética não tiveram um mesmo padrão quando contrastadas as plantas adultas e regenerantes, para toda a Reserva, lado Oeste e Leste. Apesar disto, de maneira geral, a maioria dos índices foi maior nas adultas do que nas regenerantes (Tabela 2). Em toda a Reserva, o número de alelos efetivos (Ne), o índice de diversidade de Shannon (I) e a heterozigosidade (H) estimativa do número de heterozigotos

por geração, foram maiores para as adultas. O número de alelos estimados por *locus* (Na), o número de *loci* polimórficos (NLP) e a percentagem de *loci* polimórficos foram maiores nas regenerantes.

**Tabela 2.** Índices referentes a uma população natural de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) remanescente na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus – AM), calculados em dados de marcadores RAPD.

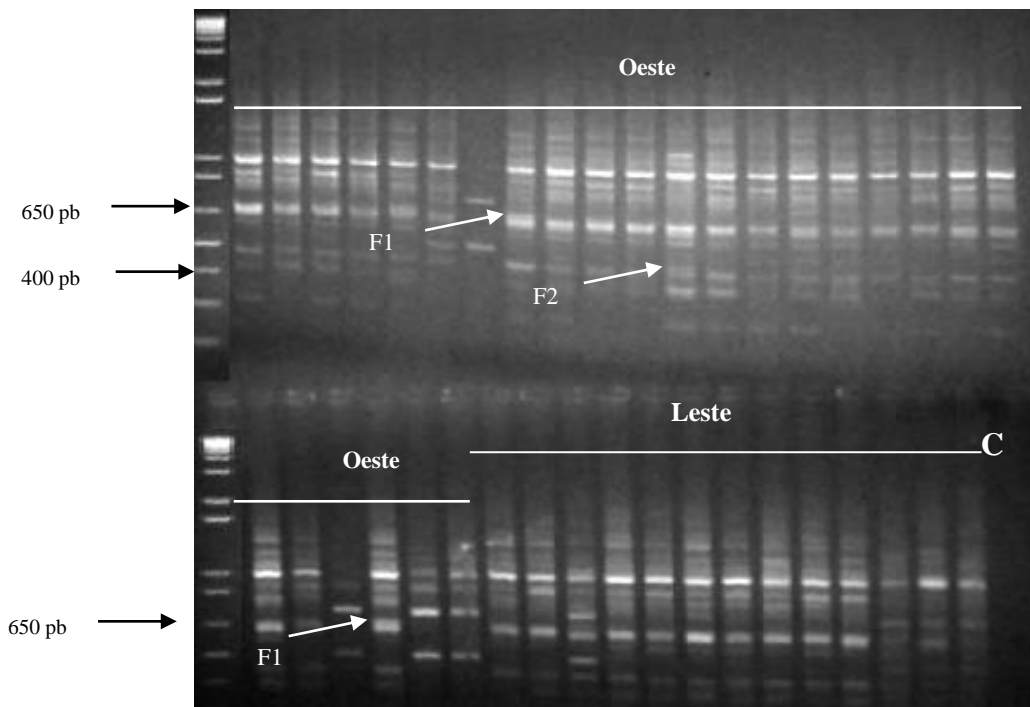
Índices	Toda a Reserva		Grupo Oeste		Grupo Leste		Oeste X Leste*	
	adultas	regenerantes	adultas	regenerantes	adultas	regenerantes	plantas do lado Oeste	plantas do lado Leste
<b>N</b>	39	60	26	25	13	35	51	48
<b>Na</b>	1,794 ± (0,412)	1,841 ±(0,367)	1,766 ± ( 0,425)	1,738 ± (0,441)	1,738 ±(0,441)	1,813 ± (0,381)	1,803 ± (0,399)	1,841 ±(0,367)
<b>Ne</b>	1,587 ± (0,389)	1,544 ±(0,342)	1,578 ± (0,395)	1,506 ± (0,386)	1,530 ±(0,392)	1,521 ± (0,341)	1,5831 ±(0,380)	1,577 ±(0,344)
<b>I</b>	0,470 ±(0,269)	0,466 ±(0,239)	0,459 ±(0,277)	0,419 ± (0,279)	0,430 ±(0,282)	0,450 ±(0,249)	0,470 ±(0,262)	0,481 ±(0,242)
<b>NLP</b>	85	90	82	79	79	87	86	90
<b>%LP</b>	79,44	84,11	76,64	73,83	73,83	81,31	80,37	84,11
<b>H</b>	0,33	0,32	0,32	0,29	0,31	0,31	0,33	0,31
<b>ID</b>	0,970		0,9681		0,9467	-	0,9902	-
<b>Nm</b>	13,460		10,682		6,6663	-	32,901	-

**N** = número de plantas; **Na** = número de alelos estimado por *locus*; **Ne** = número de alelos efetivos; **I** = índice de diversidade genética de Shannon (King & Shaal, 1989); **NLP** = número de *loci* polimórficos; **%LP** = porcentagem de *loci* polimórficos; **Nm** = estimativa do numero de migrantes por geração (fluxo gênico) (Slatkin & Barton, 1989); **H** = Heterozigosidade estimada para todos os *loci* Weir (1996) utilizando o critério de Nei (1978); **ID** = índice de identidade de Nei (1972).

\* os índices para os lados Oeste Leste foram calculados incluindo todas as plantas (adultas e regenerantes).

**OBS:** entre parênteses, o desvio das médias para valores obtidos para cada *locus*.

Entre as plantas adultas, o número de alelos totais (Na) e efetivos (Ne) e polimorfismo foi maior nas plantas do lado Oeste (Tabela 2) e está evidenciado na Figura 2 onde dois alelos aparecem apenas nas plantas amostradas do lado Oeste.



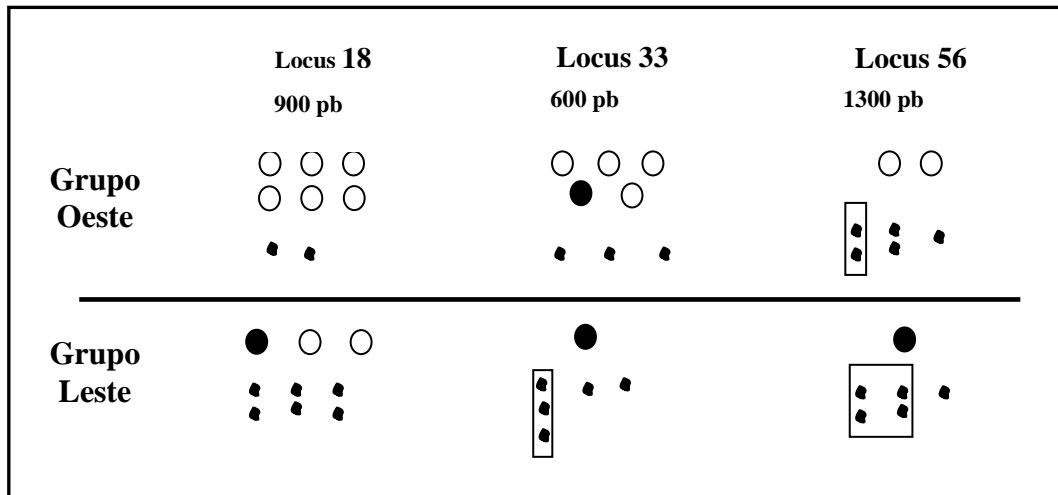
**Figura 2.** Padrão eletroforético de fragmentos RAPD – PCR do “primer” P40 em plantas adultas de Pau – rosa. As setas destacam dois fragmentos (F1 e F2) presentes apenas em adultas do lado Oeste. M= marcador de peso molecular 1 Kb Ladder Plus e C = reação controle.

Contrastados os dois lados, verificou-se a existência de características opostas. No lado Oeste da Reserva Ducke, todos os índices foram maiores nas adultas, já no lado Leste os valores foram superiores para as regenerantes, exceto o número de alelos efetivos ( $N_e$ ) que um foi maior nas adultas. Considerando todas as plantas, adultas e regenerantes, agrupadas de cada lado (Oeste X Leste), o grupo do lado Leste apresentou índices de diversidade maiores.

O fluxo gênico ( $Nm$ ) foi estimado em 13,46 entre todas as plantas adultas e todas as regenerantes da amostra de população; 10,68 entre adultas e regenerantes do lado Oeste e 6,66 entre adultas e regenerantes do lado Leste. Arranjando os grupos Leste e Oeste a estimativa do valor do fluxo gênico atingiu 32,90 (Tabela 2), sendo estimado em 16,60 migrantes por geração entre adultas e 15,00 entre os regenerantes dos dois lados.

A Figura 4 mostra o agrupamento gerado a partir de índices de similaridade de Jaccard para todas as plantas amostradas, onde verifica-se a formação de dois “clusters” distintos. O “cluster” 1 (C1) agrupou 56 plantas (20 adultas e 36 regenerantes), já o “cluster” 2 (C2) reuniu 43 plantas (19 adultas e 24 regenerantes).

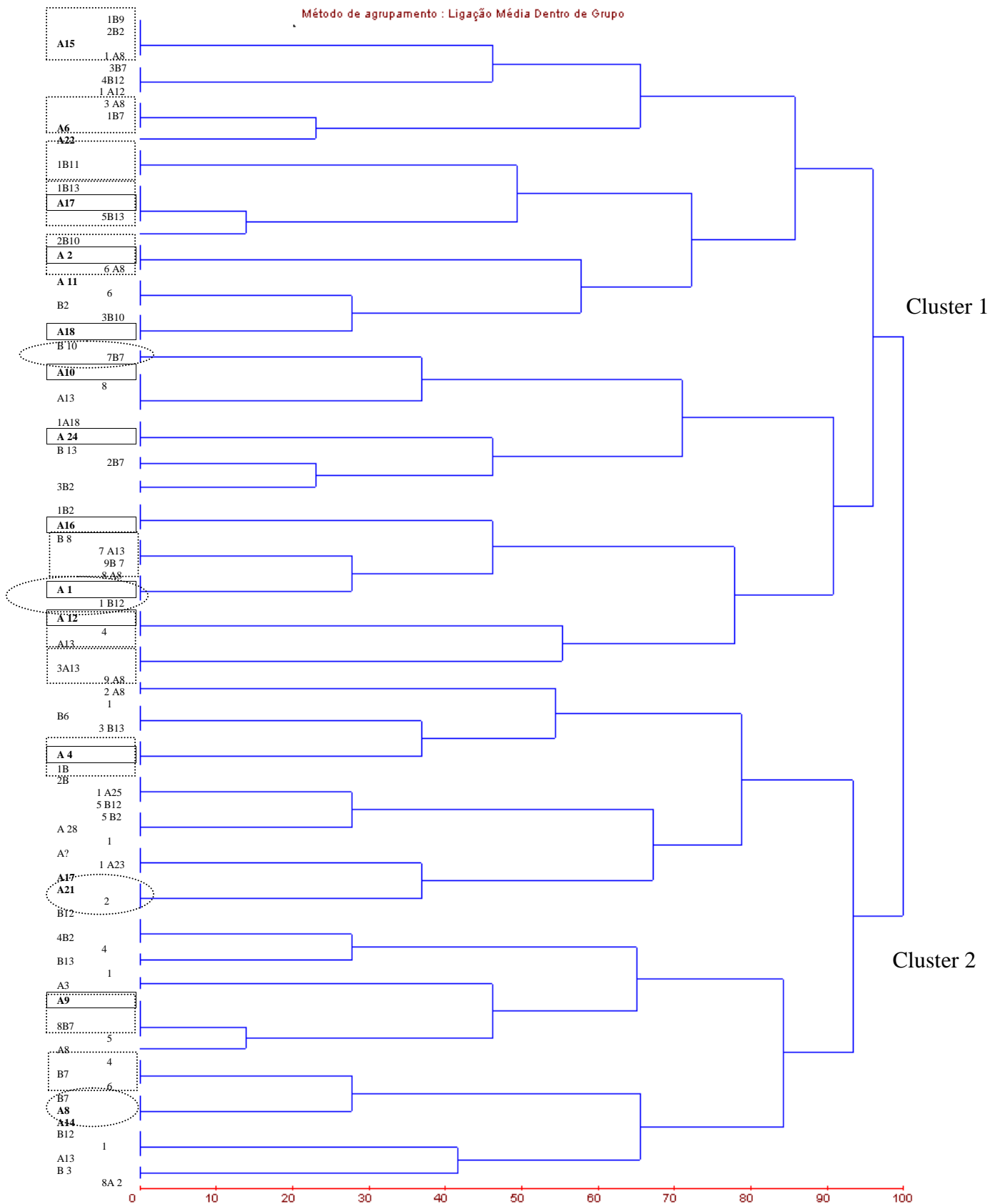




**Figura 3.** Ocorrência e distribuição de três *loci* RAPD com baixa frequência em plantas adultas e regenerantes de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM). As plantas adultas estão representadas pelos símbolos maiores: ● adultas com regenerantes sob a copa; ○ adultas sem regenerantes sob a copa. Plantas regenerantes estão representados pelo símbolo (●). Dentro dos retângulos, regenerantes que estavam sob a copa da mesma planta adulta.

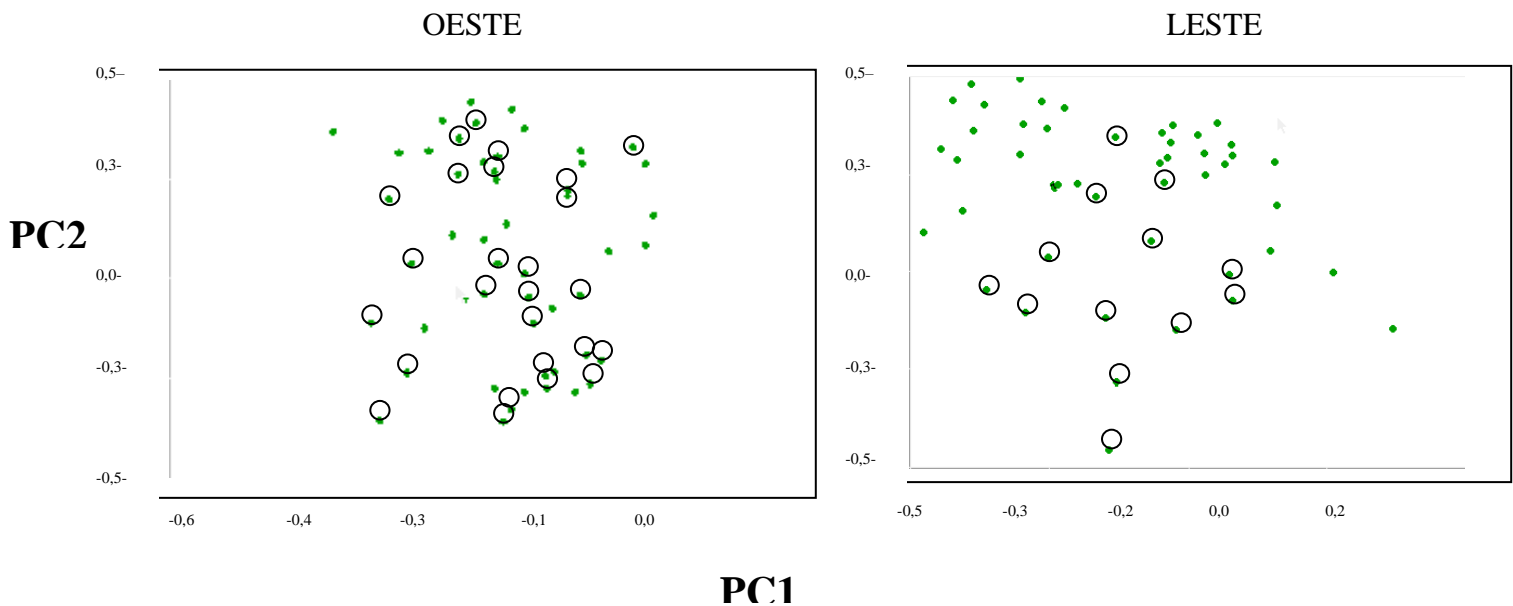
Considerando plantas adultas, há uma dominância de oriundas do lado Oeste da Reserva no “cluster” 1 (15/5) e no “cluster” 2 há um maior equilíbrio (11/8) e, também, concentração de plantas oriundas do grupo Leste. A maior parte das plantas regenerantes agrupou, por apresentar menor índice de diversidade genética, com adultas pertencentes ao grupo Oeste, independentemente de estarem localizadas geograficamente a Leste ou a Oeste da Reserva.

Considerando plantas adultas, há uma dominância de oriundas do lado Oeste da Reserva no “cluster” 1 (15/5) e no “cluster” 2 há um maior equilíbrio (11/8) e, também, concentração de plantas oriundas do grupo Leste. A maior parte das plantas regenerantes agrupou, por apresentar menor índice de diversidade genética, com adultas pertencentes ao grupo Oeste, independentemente de estarem localizadas geograficamente a Leste ou a Oeste da Reserva.



**Figura 4.** Agrupamento de 99 amostras de Pau – rosa com similaridade de Jaccard e agrupamento Ligação Média Dentro do Grupo pelo programa GENES. Plantas do lado OESTE legendadas com a letra “A” e LESTE “B”. Os retângulos e as elipses pontilhados representam para o lado Oeste e Leste, respectivamente, os agrupamentos entre adultas e regenerantes no ramo mais próximo do dendrograma.

O arranjo bidimensional das plantas gerado por revelou um maior agrupamento de regenerantes em torno das supostas mães (plantas adultas que os cobrem com a copa) no lado Oeste, do que no lado Leste, onde os regenerantes aparecem quase como um grupo independente das plantas adultas (Figura 5), o que corrobora a organização verificada no dendrograma (Figura 4).



**Figura 5.** Representação bidimensional da Análise de Componentes Principais (PCA) entre as plantas adultas e regenerantes de dois lados (OESTE e LESTE) da Reserva Ducke. As plantas dentro dos círculos são as adultas. No Oeste as plantas regenerantes estão mais agrupadas em torno das adultas que as do lado Leste. A percentagem de variabilidade explicada pelos eixos: PC1 36,06% e PC2 5,33%

Quando avaliada a correlação entre as matrizes das distâncias geográficas e distâncias genéticas (índice de dissimilaridade de Jaccard) entre todas as plantas adultas de Pau-rosa amostradas o índice de correlação foi muito baixo ( $r = 0,10$ ;  $p = 0,012$ ). Já quando correlacionou-se matrizes de distância geográfica e similaridade genética (complemento do índice de dissimilaridade de Jaccard) a correlação foi alta e significativa ( $r = 0,96$ ;  $p = 0,01$ ).

Os resultados do “Exact test” de Fisher indicaram que não houve diferença significativa quanto à distribuição de bandas ( $p < 0,05$ ), ou seja, não foram encontradas bandas restritas a grupos. Cinco bandas tiveram frequência muito baixa em ambos os lados, três das quais estão representadas na Figura 3.

## 2.4.Discussão

### **Diversidade genética entre duas gerações de plantas de Pau-rosa: adultas e regenerantes da Reserva Adolpho Ducke**

Uma das formas em que a diversidade dentro das espécies se manifesta é na variação caracterizada pela diferenciação genética entre as gerações dentro das populações. Alguns fatores demográficos e genéticos tais como o fluxo gênico localizado entre indivíduos (aparentados) vizinhos e seleção podem ser detectados por diferenças genéticas entre classes de idade (Ritland, 1989 Apud Chung *et al.*, 2000). Alguns estudos têm demonstrado essa diferenciação na estrutura genética das populações utilizando classes de idade (Yazdani *et al.*, 1985; Muona *et al.*, 1987; Kawaguici & Kageyama, 2001). Se o número de indivíduos originais em uma geração for alterado, na geração seguinte o conjunto gênico pode ser também reduzido e influenciar na diversidade genética da progênie (efeito gargalo – “bottleneck”; Futuyma, 2002). Isto pode ser explicado pelo fato de que a diversidade genética dentro das populações naturais, idealmente panmíticas, representa o balanço entre as forças evolutivas de mutação, deriva, seleção natural e ainda a migração. Sem a ação destas forças, espera-se que a diversidade genética (índice de heterozigosidade) seja mantida através das gerações. Assim, reduzir artificialmente populações pode tornar menor a diversidade disponível para as gerações subseqüentes (Ledig, 1992; Lacy, 1987; Hartl, & Clark 1989; Frankhan, 1995; Savolainen & Kuittinen, 2000).

Os maiores índices de diversidade genética quando a dispersão é endozoocórica (sementes ingeridas por animais) ou quando a polinização é pelo vento os valores respectivos de locis polimórficos são de 59,5 % e 67,8% (Hamrick *et al.*, 1992). Alguns dados de outras espécies de Lauraceae tem mostrado que: para *Cryptocaria moschata* o polimorfismo foi de 85 %, heterozigosidade calculada igual a 0,323 e esperada 0,351 (alozimas) (Moraes *et al.*, 1998) semelhantes aos nosso dados. *Ocoteae tenera* mostrou um polimorfismo de 44%, heterozigosidade de 0,174 e  $Nm$  de 1,73 (Gibson & Wheelwright, 1995) e esses autores consideraram altos níveis de diversidade. Neste sentido, a população de Pau – rosa em estudo apresenta altos níveis de diversidade genética (% de polimorfismo variando de 73,83 a 84,11; heterozigosidade entre 0,29 a 0,33; o que está coerente com dados para espécies tropicais com polinização cruzada e dispersão de sementes por animais (Hamrick *et al.*, 1992). Considerando o processo de exploração que a

espécie sofreu, especialmente nesta área, a diversidade estimada é elevada. Quando contrastada a diversidade estimada para as duas gerações amostradas (adultas e regenerantes), verificou-se uma ligeira redução de diversidade para plantas regenerantes, baseada na maior parte dos índices – número de alelos efetivos ( $N_e$ ) e índice de Shannon ( $I$ ) para todas as plantas amostradas na Reserva; todos os índices calculados para plantas do lado Oeste e o número de alelos efetivos por *locus* ( $N_e$ ) no para plantas do grupo Leste. Apenas o número de alelos efetivos ( $N_e$ ) foi menor em todos os casos nas regenerantes, indicando que há uma tendência para a diminuição da diversidade ao longo do tempo. Embora Neale (1985) não tenha demonstrado a existência de redução da diversidade genética em cinco estágios de crescimento para *Pseudotsuga menziensis* var. *menziensis* – em área manejada – outros estudos de comparação de diversidade entre áreas ou grupos submetidos a alterações antrópicas, têm mostrado haver redução na diversidade em importantes espécies como *Pithecellobium elegans* (Hall *et al.*, 1996), *Pinus strobus* (Buchert *et al.*, 1997), *Pinus contortata* var. *Engelmann* (Macdonald *et al.*, 2000) e *Scaphium macropodum* (Lee *et al.*, 2001).

Entre outras coisas, numa área onde o número de indivíduos adultos pode ser menor que o mínimo necessário, a viabilidade reprodutiva da população fica comprometida, já que a ação dos polinizadores, fundamentais no fluxo gênico, pode ser diretamente afetada por alterações nas distâncias entre as plantas (Groom, 2001) o que pode também causar a redução na diversidade. O lado Oeste apresenta maiores valores de fluxo gênico ( $Nm = 10,68$ ) entre gerações em relação ao Leste ( $Nm = 6,66$ ) o que parece ser coerente com as distâncias menores entre as plantas amostradas daquele lado (Figura 1 e Tabela 2). Por outro lado, se o fluxo gênico entre as plantas adultas e regenerantes no lado Oeste é maior, a diversidade tenderia a ser mantida o que não se observa. O fluxo gênico entre os lados ( $Nm = 32,90$ ) é muito mais alto do que o fluxo dentro de cada grupo, o que sugere que há mais troca de alelos entre os lados, isto é, provavelmente o lado Oeste parece contribuiu para o aumento da estimativa de diversidade entre regenerantes do lado Leste. Esta observação pode ser acompanhada na Figura 2, onde há alelos ocorrendo exclusivamente em adultos do Lado Oeste e um aumento dos alelos efetivos e totais ( $N_a$  e  $N_e$ ) nas regenerantes do Lado Leste do que nos regenerantes do Oeste e não nas adultas. É provável que esta transferência de alelos ocorra através de dispersão de sementes, uma vez que se houvesse dispersão de pólen entre as plantas amostradas, na mesma proporção nos dois grupos deveria haver clusterização entre adultos e regenerantes de forma semelhante para os dois grupos, em toda a Reserva, o que não ocorreu (Figura 5). O maior valor de fluxo gênico calculado para o

lado Oeste e o maior agrupamento entre adultas e regenerantes daquele lado, (demonstrado pelo dendrograma da Figura 4 e pelo PCA na Figura 5), podem ser considerados indicações de que a função do polinizador está melhor preservada do lado Oeste.

Algumas hipóteses podem ser geradas para explicar a ocorrência do aumento da diversidade estimada entre as gerações (adultas X regenerantes) no caso particular do lado Leste (Tabela 2). Principalmente, considere-se novamente o que foi exposto sobre a transferência de migrantes desde o lado Oeste para o Leste, via sementes. Adicionalmente, pode ter ocorrido uma contribuição de alelos oriundos de outros grupos (adultas) não amostrados neste estudo. Entretanto, pode-se creditar importância pequena a esta contribuição, pelo menos para *locus* não encontrados entre as plantas adultas amostradas, visto que das 107 bandas analisadas apenas uma foi encontrada apenas em regenerantes e, de resto, não foi verificado desequilíbrio drástico para nenhum dos *loci* avaliados que pudesse tornar os índices determinados para as amostras de adultas muito vulneráveis à contribuição de alelos externos para os mesmos *loci*. Pode ainda ter havido uma falha de amostragem: há no grupo do lado Oeste um equilíbrio entre o número de adultas (26) e regenerantes (25) amostradas e a diversidade cai nas regenerantes. Já no Leste, há muito mais regenerantes amostradas (35) que adultas (13) e foi verificado aumento da diversidade na geração mais jovem. Para finalizar, considerando que não houve uma subestimativa da diversidade das adultas agrupadas do lado Leste em função da amostragem, outra explicação para o aumento do índice de diversidade na geração das juvenis seria ocorrência de seleção em favor de plantas regenerantes heterozigotas. Assim, poderia ter havido uma seleção das plantas heterozigotas mais adaptadas ao ambiente do lado Leste. Esta tendência, no entanto, não é observada em toda a Reserva (há redução da diversidade no lado Oeste), e admitindo que o ambiente dos dois lados não é extremamente diferente, há pouca possibilidade de que aumento de diversidade apenas do lado Leste possa ser devido à seleção. Estas considerações foram levadas em consideração também por Seoane *et al.*, (2000) trabalhando também com variação genética entre gerações de populações de Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.), uma arbórea tropical da Mata Atlântica.

Em resumo, os resultados apresentam-se coerentes: há menor distância geográfica entre plantas do Lado Oeste, houve maior estimativa de fluxo gênico (por ação de polinizadores e dispersores) e um maior agrupamento por similaridade genética entre as adultas e as regenerantes. Já do lado Leste, as plantas estão mais distantes geograficamente, houve estimativa mais baixa de fluxo gênico (provavelmente, por haver dificuldade na transferência de pólen entre plantas) e o agrupamento por similaridade genética verificado

entre as adultas e regenerantes foi raro. Sugere-se que a recuperação de diversidade estimada para regenerantes agrupados a Leste seja gerada pelo alto fluxo gênico verificado entre os dois lados ( $Nm = 32,90$ ), o que se dá via sementes que ocorre em muito maior quantidade do Leste para o Oeste. Esta sugestão é suportada também pelos dados iniciais de dispersão de sementes para Pau – rosa na mesma área da Reserva, que indicaram que metade dos frutos foi removido das plantas adultas para outras localidades (Spironello *et al.*, 2003).

Foram encontradas indicações de tendência para a redução da diversidade, ao longo das gerações de plantas de Pau-rosa, na Reserva Adolpho Ducke. Deve-se ressaltar, no entanto, que a dimensão da diversidade não pode ser avaliada sem a comparação com uma outra área, idealmente, uma outra área que não tenha sido explorada. Portanto, toda e qualquer extrapolação dos resultados apresentados neste trabalho, deve ter em conta as características históricas da área, previamente explorada, e a maneira como as amostras foram tomadas.

### **Indícios da endemização do Pau-rosa na área da Reserva Ducke**

Um dos objetivos do trabalho era verificar a ocorrência de diferenças entre os grupos Leste e Oeste da Reserva, especialmente porque as plantas adultas do grupo Oeste estão menos dispersas e localizadas em uma área de menor cota. As plantas amostradas no lado Leste estão quase todas sobre o platô central e mais dispersas geograficamente. Além disso, é um dado reconhecido como verdade, na Região de Manaus, que a porção Oeste da Reserva foi mais exposta à exploração pelas destilarias de óleos essenciais, antes do estabelecimento da Reserva Florestal Adolpho Ducke.

São indícios de que os grupos Leste e Oeste apresentam estrutura genética um pouco diferente, os índices de diversidade de Shannon ( $I$ , Tabela 2), o número de alelos efetivos por *locus* ( $N_e$ ), o número de *loci* polimórficos (NLP), o grau de identidade entre os grupos testados dentro de cada lado (ID) e a amplitude do fluxo entre os dois lados e entre as gerações de plantas agrupadas de cada lado ( $Nm = 32,90$ , Tabela 2).

Há uma perda de diversidade entre gerações relativamente acentuada do lado Oeste. As adultas apresentam índice de Shannon igual a 0,459 e regenerantes 0,419, o que está coerente com a existência de um grau de correlação alto entre distância geográfica e

similaridade genética ( $r = 0,96$  e  $p = 0,01$ ; teste de Mantel, 1967). Uma das causas mais prováveis para esta redução da diversidade, verificada por contraste de apenas duas gerações, seria a redução do número de indivíduos adultos que contribuiu efetivamente para a gênese das plantas juvenis. Do lado Leste, ao contrário, há uma recuperação de diversidade, com adultas apresentando índice 0,430 e regenerantes, índice 0,450, muito próximo do encontrado para adultas do Oeste. No entanto, o número de alelos efetivos por *locus* não é maior entre regenerantes deste lado Leste ( $N_e = 1,521$ ) do que entre adultas ( $N_e = 1,530$ ), enquanto o número de *loci* polimórficos o é ( $NLP = 87$  para regenerantes e 79 para adultas), único caso em que se deu a oposição entre estes dois índices. Então, pode-se supor que a recuperação da diversidade que foi verificada para o lado Leste ocorreu menos em função da aquisição de novos alelos e mais em função da alteração do grau de polimorfismo dos marcadores utilizados. Os mesmos marcadores seriam mais polimórficos entre regenerantes que entre adultos do lado Leste. Estas observações são ratificadas pelo padrão de distribuição das bandas (“Exact test”) em que não se verifica a existência de bandas típicas para cada lado, mas há registro de um maior número de bandas polimórficas entre regenerantes do lado Leste (Tabela 2).

Para correlacionar todas estas informações apresenta-se uma hipótese: passada a época de exploração, o fluxo gênico entre as plantas foi alterado de duas maneiras, ficando, em primeiro lugar, alterado o número de plantas vivas que contribuiriam com gametas para as próximas gerações e, em segundo lugar, ficando reduzida a capacidade de atuação dos polinizadores em promover a dispersão de pólen, porque em função do reduzido tamanho (Kubitzki & Kurtz, 1984; Spironello *et al.*, 2003) devem ter amplitude de vôo curto e dificuldade de interagir com plantas muito distantes entre si. Então, por causa da organização no espaço das plantas amostradas do lado Oeste pode-se admitir que as possibilidades de polinização cruzada via Meliponinae ou tripses sejam maiores, onde as plantas estão concentradas em um espaço pequeno. O transporte de pólen entre plantas do Leste deve ser mais difícil por esta via. Foi, de fato, estimado um maior fluxo gênico entre as plantas das duas gerações para o lado Oeste ( $N_m = 10,68$ ) que entre as plantas das duas gerações no grupo Leste ( $N_m = 6,66$ ). O limite inferior para que se admita a ocorrência de população panmítica é de 4 migrantes (Hartl e Clark, 1997).

Admitindo esta hipótese, fica caracterizada a existência de um deme do lado Oeste, dentro do qual há polinização cruzada entre um pequeno número de plantas adultas reunidas em um grupo remanescente da exploração. Este deme tenderia à perda de diversidade por endemização. O índice de identidade entre o grupo de adultas e o grupo de regenerantes (ID,



Tabela 2) é maior (0,968) do lado Oeste do que do lado Leste (0,947) e, como conjunto (adultas + regenerantes), há menos diversidade (ID, Tabela 2) estimada para o grupo de plantas do lado Oeste (0,470) do que para aquele do Leste (0,482) da Reserva Ducke.

Apesar da perda de diversidade verificada entre gerações do Oeste, este é o lado que parece contribuir para a recuperação da diversidade no lado Leste. As plantas adultas amostradas do lado Leste parecem ter produzido, surpreendentemente, um número menor de regenerantes do que as do lado Oeste, embora um número maior de amostras de folhas de plantas juvenis tenha sido coletado sob copas de árvores adultas localizadas do lado Leste. Ocorre que os regenerantes amostrados a Leste, estão, por similaridade genética, muito mais freqüentemente associados às plantas adultas do lado Oeste (Figuras 3 e 4). Para justificar esta ocorrência há que se considerar a importância das aves dispersoras de sementes e a existência de um fluxo gênico intenso ( $Nm = 32,90$ ) entre os dois lados. Assim, em função da dependência dos polinizadores, haveria mais sucesso reprodutivo para indivíduos do lado Oeste e as plantas juvenis produzidas neste lado estariam influenciando o aumento da estimativa de diversidade do lado Leste: provavelmente homozigotos para a ausência de bandas (regenerantes do lado Oeste) sendo recebidas em um grupo onde a presença destas bandas era generalizada (adultas do lado Leste).

Fica implícita a noção da importância da Reserva Florestal como instrumento da manutenção da biodiversidade de todas as espécies inseridas num mesmo ecossistema e atente-se para a possível diversidade de habitats nos ecossistemas.

## **2.5. Conclusões**

1. Ocorreu uma ligeira perda de diversidade genética ao longo das gerações avaliadas, o que pode ser consequência do processo de exploração que ocorreu na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM).
2. Há tendência para a endemização da população amostrada, com redução da diversidade do lado Oeste e provável redução crônica do número de regenerantes descendentes de plantas do lado Leste.

## Capítulo 3

### Estimativas da diversidade e divergência entre quatro populações naturais de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) utilizando marcadores RAPD

#### 3.1. Introdução

A diversidade genética dentro das espécies é um dos componentes da Biodiversidade do planeta juntamente com e a diversidade entre espécies (dentro de um ecossistema) e a variação nos ecossistemas (Frankhan, 1995). A diversidade dentro das espécies é o componente fundamental no processo da evolução dos organismos vivos uma vez que é responsável pela capacidade de adaptação das espécies às alterações ambientais (Lande & Shannon; Young *et al.*, 1996; Geburek, 1997; Primack & Rodrigues, 2002).

Alguns fatores influenciam diretamente os níveis de diversidade em espécies florestais como características ecológicas de distribuição geográfica e regional, o tipo de sistema de cruzamento, o tipo de dispersão de sementes, o modo de reprodução e o grupo sucessional a que as espécies pertencem (Hamrick *et al.*, 1992). De uma maneira geral, os níveis de diversidade genética são considerados mais elevados nas espécies florestais arbóreas que em outros grupos de plantas (Hamrick *et al.*, 1992) o que pode ser, em parte, explicado pelas características da biologia reprodutiva com mecanismos que privilegiam a fecundação cruzada, altas taxas de polinização via insetos e elevada dispersão zoocórica de sementes (Bawa *et al.*, 1985; Hamrick *et al.*, 1992; Campbell & Peart, 2001).

Assim, o conhecimento dos níveis de diversidade genética e compreensão da sua distribuição dentro e entre populações naturais, sobretudo em espécies ameaçadas de extinção, é importante ecologicamente e para definição de medidas de manejo florestal e conservação, de forma que a utilização dos recursos naturais seja sustentável (Bawa, 1990; Lindenmayer *et al.*, 2000; Jennings *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2001; Escuredo *et al.*, 2003)

A princípio, o que se espera é que a diversidade genética seja menor em espécies ameaçada de extinção ou que sofreram historicamente processos predatórios intensos (Lacy, 1987; Buza *et al.*, 2000; Matocq & Villablanca, 2001), tais como o Pau – rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Esta espécie está incluída na lista de espécies ameaçadas (IBAMA, 1992) em função das intensas atividades de exploração a que foi submetida no século passado, para a obtenção do óleo essencial rico em linalol, que tem alto valor comercial. O

Pau – rosa é uma espécie de fecundação cruzada, polinizada por pequenos insetos (Kubitzki & Kurtz, 1984) e que sofre dispersão de sementes realizada por pássaros, sobretudo tucanos, que deslocam cerca de metade das sementes produzidas (Spironello *et al.*, 2003). Apesar de ocorrer em toda a Amazônia (Kubitzki & Renner, 1982) o Pau- rosa tem uma densidade populacional muito baixa (menos de duas plantas por hectare, SUDAM, 1972) tendo sido a densidade reduzida pela intensa remoção de árvores. Muito embora seja um dos recursos genéticos da Amazônia considerados mais estratégicos, não existem dados a respeito de características genéticas, tais como a distribuição da diversidade e fluxo gênico em suas populações naturais.

Objetivou-se com este trabalho definir os níveis de diversidade genética dentro e entre populações naturais de Pau – rosa, remanescentes em áreas de exploração, utilizando marcadores moleculares RAPD, assim como:

- a) estimar valores de fluxo gênico entre as populações;
- b) testar a relação existente entre as distâncias genéticas, a distribuição espacial (geográfica) e o fluxo gênico e
- c) verificar a ocorrência de estruturação da diversidade das populações.

## **3.2. Material e Métodos**

### **Áreas de coleta**

Os pontos onde foram coletadas amostras estão indicados na Figura 1. Os municípios de Maués, Parintins, Silves e Manaus pertencem à Amazônica Central, sendo que Manaus pertence ao Médio Amazonas e os demais municípios ao Baixo Amazonas (IBGE, 1991). Nesta região central, especialmente próximo a Manaus, o gênero *Aniba* possui alta diversidade (Kubitzki & Renner, 1982). As plantas amostradas em Manaus na área da Reserva Florestal Adolpho Ducke está a 26 km ao norte de Manaus, em área de alta diversidade e de prioridade para conservação de espécies. O município de Silves é certamente um dos poucos locais onde populações remanescentes de Pau – rosa ainda podem ser encontradas com maior frequência. As regiões de Parintins e principalmente Maués sofreram maior exploração. As amostras de tecido vegetal oriundas dos municípios de Silves, Parintins e Maués foram coletadas no interior destes municípios (comunidades), nas proximidades das áreas de ocupação urbana.

### **Coleta de material**

Foram coletadas folhas jovens de plantas adultas dos quatro pontos em estudo, sendo amostradas 37 plantas da Reserva Ducke (Manaus) e 24 plantas de cada uma das outras populações. As amostras dos municípios de Maués, Silves e Parintins foram coletadas nos anos de 2000 e 2001, como parte do projeto financiado pelo PRODETAB e aquelas da Reserva Ducke, em 2003. Todas as folhas coletadas foram acondicionadas em tubos plásticos devidamente identificados, contendo sílica gel (Chase & Hills, 1991) e assim foram transportadas até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, onde foram preservadas em “freezer” à temperatura de – 20 °C.

### **Extração e quantificação de DNA**

Amostras de folhas de plantas da Reserva Ducke foram submetidas à extração de DNA conforme o descrito nos Capítulos 1 e 2 deste trabalho. Para as demais foi utilizado o tampão de extração com CTAB (Doyle & Doyle, 1987; Quirsen *et al.*, 2003). Realizou-se a quantificação do DNA por espectrofotometria, conforme descrito no Capítulo 2.

## Reações RAPD – PCR

Utilizou-se quatro “primers” decâmeros de seqüência arbitrária com 50 – 60 % de CG para as análises (P4, P16 e P48, Tabela 1 do Capítulo 2) e o P22 (3´- AATCGGGCTG -5´) (GIBCO BRL – Invitrogen). As condições das reações RAPD – PCR, obtenção das imagens e anotações dos dados estão descritos nos Capítulos 1 e 2.

## Análises genéticas e estatísticas

Estimativas da distribuição da diversidade genética foram feitas através do cálculo dos parâmetros  $H_t$  (diversidade geral),  $H_s$  (diversidade dentro das populações) e  $G_{st}$  (diversidade entre as populações) de acordo com Hartl & Clark, 1989 utilizando o *software* POPGENE - versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Utilizando o mesmo *software*, foram calculados os índices de diversidade de Shannon (Lewontin, 1972; King & Shaal, 1989) o número de alelos totais e efetivos por *loci*, número de *loci* polimórficos e a percentagem de *loci* polimórficos.

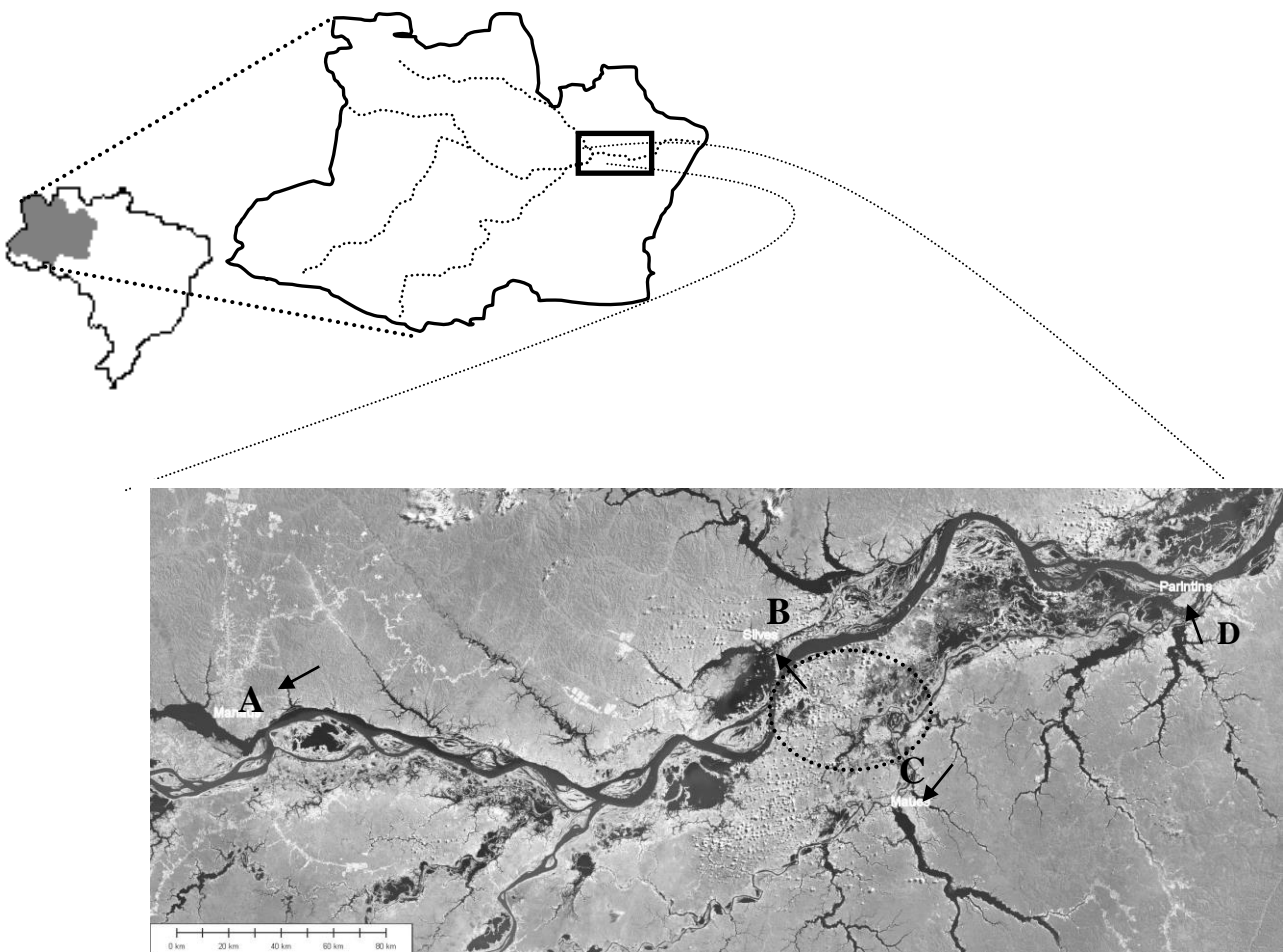
Estimou-se, ainda, a heterozigosidade média para as populações, onde a relação de dominância não é considerada de acordo com Weir (1996) utilizando o critério de Nei (1978) no *software* TFGPA 1.3 (Miller, 1997). Estimou-se o fluxo gênico, pela média do número de migrantes por geração ( $N_m$ ) (Lewontin, 1962; Slatkin & Barton, 1989), entre todos os grupos e entre cada um separadamente utilizando o *software* POPGENE.

Para avaliar a grau de diferenciação entre as populações, utilizou-se o teste de Fisher - “Exact Test” (Raymond & Rousset, 1995) no *software* TFGPA, onde verificou-se a existência de diferenças significativas entre os marcadores (bandas), tomando-se como critério a comparação individual de cada marcador e também todos os marcadores juntos em cada população.

As distâncias geográficas entre os pontos foram obtidas diretamente utilizando-se mapas georeferenciados (IBGE e Imagens de satélite Landsat TM disponíveis no GISLAB, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA).

Fez-se teste de correlação entre a matriz de distância geográfica e as matrizes de distância genética e de fluxo gênico, assim como entre fluxo gênico e distância genética para avaliar a correlação entre estas variáveis; estes testes foram feitos no *software* TFGPA na rotina teste de Mantel (1967) utilizando-se 1000 permutações.

A distância ou divergência genética entre as populações foi analisada pelo *software* TFPGA, onde utilizou-se a distância de Nei (1978). O *software* gerou, a partir de uma matriz de distâncias, um agrupamento entre as populações por meio do algoritmo UPGMA (média aritmética não ponderada). A tendência de agrupamento também foi testada via: 1) cálculo dos índices de similaridade genética de Jaccard entre os indivíduos e utilizando o método de agrupamento UPGMA. 2) por meio da Análise de Componentes Principais (PCA). Ambos os procedimentos foram feitos no *software* NTSYS – pc versão 1,04 (Rohlf, 1990).



**Figura 1.** Localização dos pontos onde foram coletadas as amostras de indivíduos adultos de Pau – rosa. A- Reserva Ducke (Manaus); B-Silves; C-Maués e D- Parintins. O círculo destaca área sujeita a alagamento no período da subida do rio entre Maués e Silves. Fonte: GISLAB – INPA (Landsat TM).

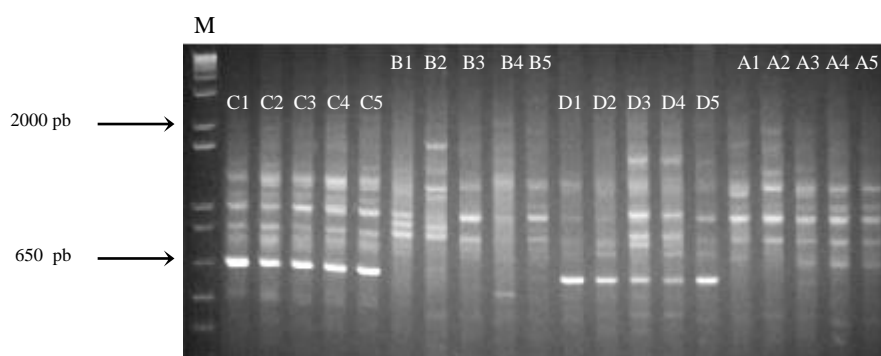
### 3.3. Resultados

A figura 1 mostra a localização espacial dos pontos de amostragem das quatro populações no Médio (Manaus (A) e Baixo Amazonas (Maués (C), Silves (B) e Parintins (D)).

Os quatro “primers” geraram 51 fragmentos sendo que 50 mostraram-se polimórficos o que equivale a 98,04 % do total. O tamanho dos fragmentos variou para cada “primer” de 460 a 1900 pb (P4); de 470 a 1860 pb (P16); de 530 a 1500 pb (P22).e de 450 a 2520 pb (P48).

As estimativas da diversidade genética para as quatro populações foram: de ( $H_t$ ) 0,387; dentro das populações ( $H_s$ ) de 0,310 e a diversidade entre as populações ( $G_{st}$ ) de 0,077. A maior parte da diversidade se encontra, portanto, dentro das populações (80,1%).

Analisando o conjunto de , o Exact “test” mostrou haver diferença entre todas as populações sendo, que dos 51 *loci* amostrados apenas 16 tiveram distribuição significativamente diferente ( $p = 0,05$ ). Dois *loci* apresentaram-se exclusivamente em algumas das populações avaliadas. Um deles (banda H do P16 com 1000 pb) ocorreu exclusivamente em plantas da população de Manaus. Um outro, a banda F do P22 com 650 pb, foi encontrada em plantas das populações de Maués (C) e Parintins (D) (Figuras 1 e 2). Embora a Figura 2 mostre apenas em cinco plantas por população, o padrão da banda F do P22 foi igual pra todas as amostras.

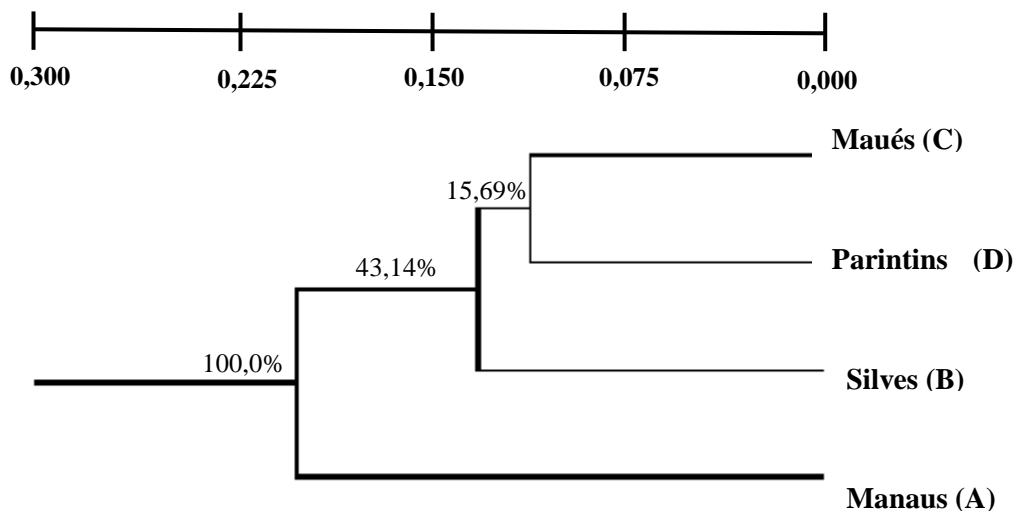


**Figura 2.** Padrão eletroforético de bandas RAPD-PCR em amostras de quatro populações de Pau – rosa: A-Ducke; B- Maués; C-Silves e D-Parintins e. M= marcador 1 Kb Ladder. O fragmento com tamanho médio de 650 pb aparece apenas nas populações C e D.



A divergência entre as populações possibilitou a formação de dois grupos distintos, ficando a população de Manaus (A) isolada das demais (Figura 3). As populações do Baixo Amazonas (Silves - B, Maués - C e Parintins - D) divergiram da população de Manaus (A), sendo estas três últimas mais similares geneticamente conforme também é indicado pelos valores dos índices de identidade genética de Nei (Nei, 1972, Tabela 1).

Quando agrupou-se as plantas amostradas pelo método UPGMA, utilizando índices de similaridade de Jaccard, observou-se que a população de Silves (B) apresenta agrupamento mais coeso que as demais (Figura 4). A população de Manaus (A) apresentou-se organizada em dois grupos e Maués (C) e Parintins (D) geraram grupos intercalados. A Análise de Componentes Principais (Figura 5) também demonstra a sobreposição entre as populações de Maués e Parintins. Na figura 5 também pode-se verificar o maior grau de coesão no agrupamento nas plantas da população de Silves (B) e a maior dispersão das plantas de Manaus (A).



**Figura 3.** Agrupamento de quatro populações de Pau – rosa utilizando as distâncias de Nei (1978) e o critério UPGMA. Em cada ramo, o valor da porcentagem de *loci* que dá suporte a análise.

Quando agrupou-se as plantas amostradas pelo método UPGMA, utilizando índices de similaridade de Jaccard, observou-se que a população de Silves (B) apresenta agrupamento mais coeso que as demais (Figura 4). A população de Manaus (A) apresentou-se organizada em dois grupos e Maués (C) e Parintins (D) geraram grupos intercalados. A Análise de Componentes Principais (Figura 5) também demonstra a sobreposição entre as populações de Maués e Parintins. Na figura 5 também pode-se verificar o maior grau de coesão no agrupamento nas plantas da população de Silves (B) e a maior dispersão das plantas de Manaus (A).

Quando analisadas as correlações existentes entre as matrizes de distância genéticas (Dgen.) e geográficas (DG) pelo teste de Mantel foi detectado um valor positivo moderado ( $r = 0,75$ ;  $p = 0,22$ ); entre distâncias geográficas (DG) e índices de fluxo gênico ( $Nm$ ) foi  $r = (-0,76$ ;  $p = 0,17$ ); e distâncias genéticas (Dgen.) e fluxo gênico ( $Nm$ ) valor alto e negativo  $r = (-0,99$ ;  $p = 0,09$ ).

Os índices utilizados para estimar a diversidade genética apresentaram sempre valores mais altos para a população de Manaus, seguida por Maués, Silves e Parintins (Tabela 2). De maneira geral, a diversidade decresceu do oeste para leste (Figura 1 e Tabela 2).

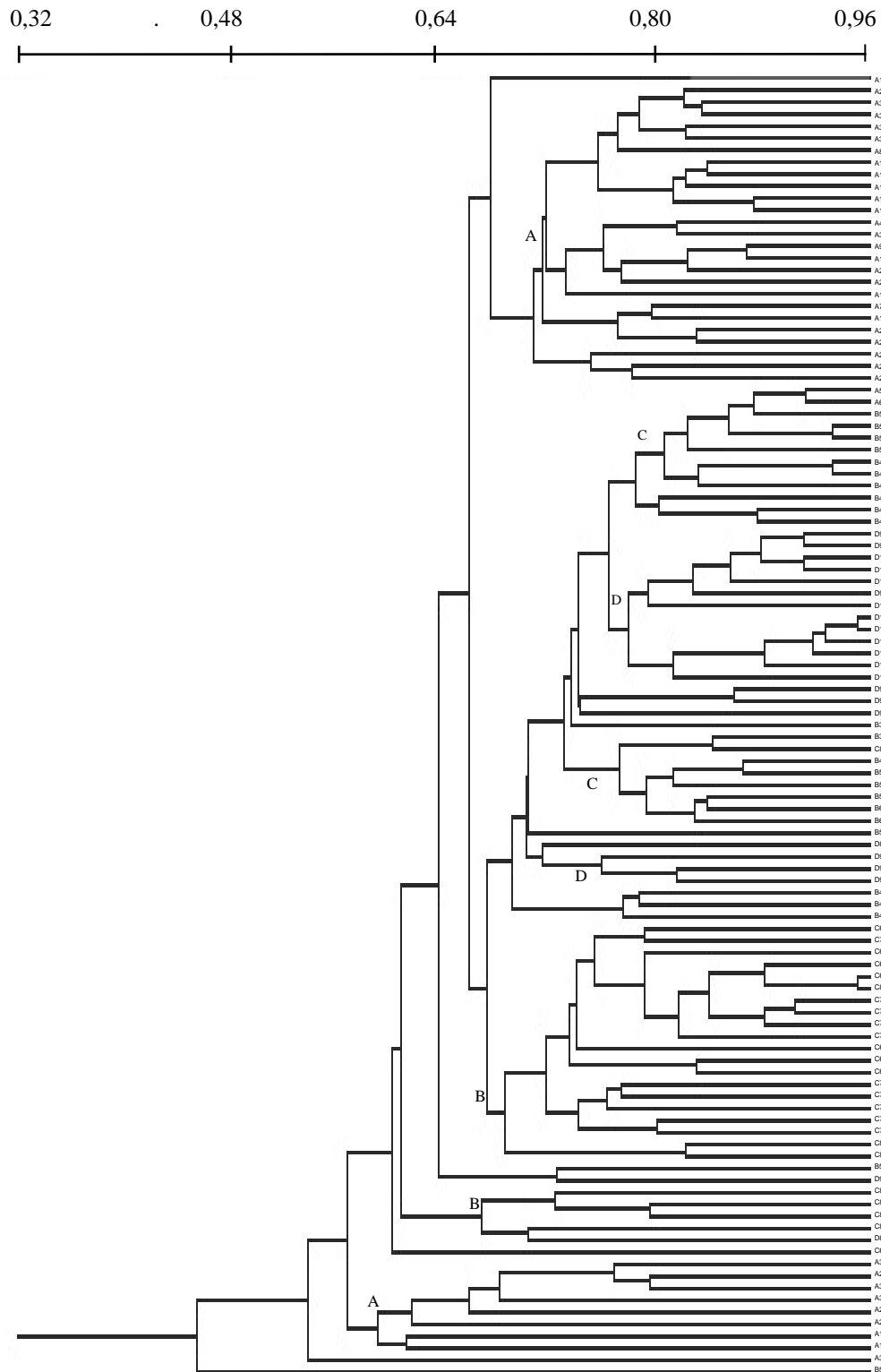
**Tabela 1.** Matriz de dados calculados para quatro populações de Pau – rosa, referentes à distância geográfica em km (DG), identidade genética (ID) (Nei, 1972) e fluxo gênico ( $Nm$ ) (número de migrantes por geração).

	Reserva Manaus (A)			Silves (B)			Maués (C)		
	DG	ID.	Nm	DG	ID	Nm	DG	ID	Nm
Silves (B)	200	0,8171	2,52	-	-	-			
Maués (C)	264	0,8191	2,58	87	0,8668	3,46	-	-	-
Parintins(D)	370	0,8185	2,46	170	0,8884	3,82	135	0,8944	4,23

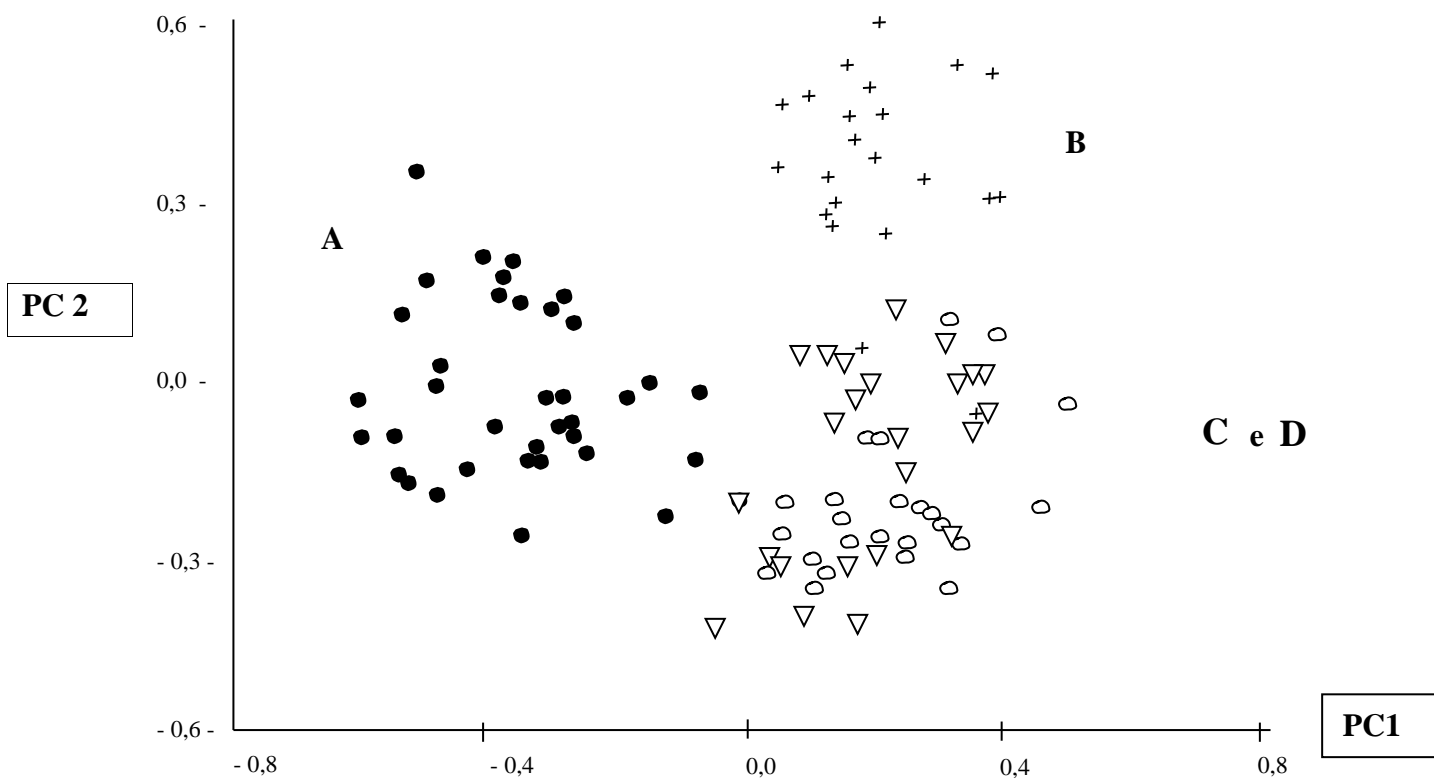
**Tabela 2.** Índices gerados com marcadores moleculares RAPD para quatro populações de Pau – rosa oriundas de quatro municípios do Estado do Amazonas.

Municípios	Manaus (A)			
	(Reserva Ducke)	Silves (B)	Maués (C)	Parintins (D)
N	37	24	24	24
Na	1,8235 ± (0,3850)	1,7255 ± (0,4507)	1,7647 ±(0,4284)	1,7059 ± (0,4602)
Ne	1,5691 ±(0,3553)	1,5660 ±(0,3997)	1,5603 ±(0,3692)	1,5282 ± (0,3974)
I	0,4742 ±(0,2487)	0,4451 ±(0,2921)	0,4571 ±(0,2727)	0,4258 ± (0,2900)
NLP	42	37	39	36
Poli.	82,30	72,54	76,40	70,58
H	0,3319	0,3180	0,3269	0,3041

N= número de amostras; Na=número de alelos observados por loci ; Ne=número de alelos efetivos (Hartl & Clark, 1989); I= Índice de diversidade de Shannon; NLP= número de *loci* polimórficos; porcentagem de loci polimórficos (com 99% de critério) e H = heterozigiosidade; entre parêntese o desvio das médias.



**Figura 4.** Agrupamento de todos os indivíduos de quatro populações de Pau – rosa. A – Reserva Ducke (Manaus); B- Silves;C- Maués e D – Parintins. O índice de similaridade utilizado foi o de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.



**Figura 5.** Representação bidimensional da Análise de Componentes Principais entre quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) calculados em marcadores moleculares RAPD – PCR. Populações: A-Manaus (●); B-Silves (†); C-Maués (▽) e D-Parintins (○). O eixo PC1 explica 25,58% da diversidade e o PC2 10,10%.

### 3.4. Discussão

Os maiores índices de diversidade genética têm sido reportados para espécies tropicais, quando a dispersão é endozoocórica (sementes ingeridas por animais), e quando a polinização é pelo vento com valores respectivos de *loci* polimórficos de 59,5 % e 67,8% (Hamrick *et al.*, 1992). No caso de Lauraceae não tem sido diferente. Análises de populações naturais de *Cryptocaria moschata* (espécie arbórea da Mata Atlântica) por exemplo, indicaram um polimorfismo de 85,0%, heterozigosidade calculada igual a 0,323 e esperada 0,351 (alozimas) (Moraes *et al.*, 1998); para *Myrciaria floribunda* (também arbórea de sub bosque Mata Atlântica) o polimorfismo estimado com marcadores isoenzimáticos foi de 85,71% e a heterosigozidade variou de 0,288 a 0,386 entre populações (Vasconcelos, 2002), próximos aos valores mostrados aqui neste trabalho para Pau - rosa. Já estudos na América Central com *Ocotea tenera*, também com isoenzimas apresentaram percentagem de 44%, heterozigosidade de 0,174 e Nm de 1,73 (Gibson & Wheelwright, 1995) e esses autores consideraram altos estes níveis de diversidade quando comparados com outras espécies tropicais.

Os níveis de diversidade genética nas espécies tropicais estão muito mais concentrados dentro das populações que entre estas. Em média, apenas 24 % da diversidade total é entre as populações (Hamrick *et al.*, 1992). Para Pau – rosa, os resultados apresentaram que sua diversidade está muito mais contida dentro das populações ( $H_s = 0,310$ ; 80,1%) indicando um padrão muito semelhante às espécies tropicais de polinização cruzada e dispersão de sementes zoocórica. Embora ameaçada de extinção, as populações de Pau – rosa possuem elevados valores de diversidade genética revelados pelos índices estimados na Tabela 2. Recentes estudos com espécies tropicais que sofrem com intensa exploração têm apresentado valores de alta diversidade, mesmo sendo muito intensa a pressão exploratória como aquela observada sobre *Dinizia excelsa* (Fabaceae) e Mogno (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) (Dick, 2001; Lemes *et al.*, 2003). O que se tem discutido é que a seleção artificial dos indivíduos com maior diâmetro à altura do peito - DAP e mais altos promove a remoção apenas de uma parte da diversidade, sendo que a maior parte permanece nos estágios mais jovens. Uma das implicações destas características é que a busca de diversidade para futuros programas de conservação ou para programas de melhoramento, por meio de coletas, deve ser ampliada de forma que todos os grupos ou populações sejam representados, já que há uma diferenciação entre as populações.

Leite *et al.*, (1999) fizeram algumas recomendações para a conservação do Pau – rosa na Reserva Ducke que é considerada, também, área prioritária no diagnóstico e identificação da diversidade, sobretudo para as espécies ameaçadas de extinção na Amazônia (Nelson e Oliveira, 2001), como o Pau – rosa. Das quatro populações avaliadas a de Manaus (A), na Reserva Ducke, apresentou maiores valores para todos os índices utilizados para estimar a diversidade (Tabela 2).

Para Parintins (D), a população menos diversa (índice de Shannon = 0,4258), apesar de manter fluxo gênico de  $Nm = 4,23$  com a população de Maués (B) - que apresenta índice de diversidade de Shannon de 0,4571 (Tabela 2) - o indício mais forte é de que tenha ocorrido erosão genética resultante da exploração, já que se trata de uma das áreas reconhecidamente mais exploradas. Uma das possíveis causas para os maiores valores de diversidade para Manaus (A) pode ter sido o número de amostras. Da população de Manaus foram analisadas 37 plantas, enquanto das demais coletou-se 24 plantas em cada uma. Deve-se considerar, ainda, que a Reserva Ducke está protegida de exploração há 40 anos e as demais populações certamente continuaram sendo exploradas, sobretudo Maués e Parintins (C e D). Isto pode implicar que os maiores índices de diversidade na população de Manaus estão associados à proteção. Assim, apesar dos dados serem iniciais e apenas para quatro populações, a criação da Reserva Ducke (população de Manaus) parece ter contribuído para a recuperação parcial da diversidade desta espécie funcionando como área de conservação *in situ*.

Semelhante a Pau- rosa, alta diversidade tem sido reportada para espécies de Lauraceae, o que pode estar associada às características ecológicas destas espécies como dioiccia, protoginia e dispersão de sementes (Kubitzki & Kurtz, 1984; Bawa *et al.*, 1985; Hamrick *et al.*, 1992; Wheelwright, 1993; Gibson & Wheelwright, 1995; Moraes *et al.*, 1998; Myong *et al.*, 2000; Vasconcelos, 2002; Spironello, *et al.*, 2003).

As mudanças significativas nas frequências dos marcadores, apontadas pelo “Exact Test” ( $p = 0,05$ ) ratificam os resultados estimados para o fluxo gênico entre as populações ( $Nm = 2,02$ ), uma vez que quando este é baixo, as discrepâncias detectadas implicam no surgimento de características típicas para alguns dos grupos. As populações de Maués (C) e Parintins (D), com  $Nm = 4, 23$ , parecem tender a apresentar um comportamento mais típico de uma única população, já que a existência de população panmítica é admitida quando a estimativa de fluxo gênico excede ao valor 4,0 (Hartl e Clark, 1997). Em todos os dados analisados esta tendência é verificada. Por exemplo, estas populações (C e D) apresentam índices de identidades (Nei, 1972) maiores (ID, Tabela 2) e menor distâncias genéticas (Nei,

1978, Figura 3) além do maior fluxo gênico (Tabela 2). Estas populações compartilharam um *locus* (Figura 2) que não está presente nas outras populações (Manaus – A e Silves – B). Isto também pode ser constatado através da sobreposição dos indivíduos destas duas populações (Figuras 4 e 5). As explicações para essa maior aproximação genética e maior fluxo gênico entre Maués e Parintins (distância geográfica = 135 km) do que entre Silves e Maués (87 km) são que: primeiro, Silves e Maués (B e C) estão separadas pelo Rio Amazonas (Figura 1), o que pode ter restringido o fluxo gênico. Outra hipótese é que as populações de Pau – rosa tendem a ser encontradas em platôs em detrimento a áreas baixas e sujeitas a inundações. Assim, observa-se na Figura 1 a formação de uma área que sofre alagamento nas estações de subida das águas, o que pode ter separado as populações. O oposto acontece entre as populações de Maués (C) e Parintins (D), que estão ligadas por um platô sem áreas sujeitas a alagamento e que poderiam estar organizadas em um “cline”.

Os mais baixos índices de diversidade e de fluxo gênico podem explicar a possível endemização ocorrendo na população de Silves –B (Tabelas 1 e 2). Se por um lado as barreiras físicas limitam mais o fluxo gênico entre Silves e Maués, as distâncias geográficas influenciam o menor fluxo gênico entre Silves e Parintins e também entre Silves e Manaus. Desta forma, a tendência é a maximização da troca de genes entre os mesmos indivíduos dentro da população de Silves, com conseqüente redução relativa de diversidade. Por estas razões, para a população de Silves (B) há um ligeiro isolamento, em relação à Maués e Parintins (C e D) e também a Manaus (A) o que fez com que houvesse uma maior endemização mostrada também na Figura 4.

A divergência ou diferenciação genética entre populações naturais está associada ao isolamento destas pela distância geográfica, sendo que geralmente detecta-se redução nos valores de fluxo gênico e distância genética com o aumento da distância geográfica (Barbujani, 1987; Bossart & Prowell, 1998). Assim, a distância geográfica somente não explica os resultados obtidos para as populações de Silves e Maués. Neste caso, outro fator mais importante a se considerar seria a limitação do fluxo gênico via polinizadores e dispersores de sementes em função de uma barreira geográfica –Rio Amazonas e áreas alagadiças, sem ocorrência de Pau – rosa - o que reduziria o fluxo gênico. Quando se testou esta associação entre os pares de populações através do teste de Mantel (1967), de fato, o grau de correlação entre as distâncias geográficas (DG) e os valores de fluxo gênico ( $Nm$ ) explicaram apenas em parte esta tendência para as populações de Pau – rosa, o que indica influência decisiva das distâncias entre as populações, mas não absoluta sobre a interação entre elas ( $r = - 0,76$ ;  $p = 0,17$ ). No entanto, a correlação entre o fluxo gênico e distância



genética foi quase absoluta ( $r = -0,99$ ;  $p = 0,09$ ) indicando a maior influência do fluxo gênico sobre as distâncias genéticas entre as populações.

Claramente se observa que a população de Manaus (A) divergiu das demais o que certamente foi influenciado pela distância geográfica e determinado pelo mais baixo fluxo gênico. Não se pode deixar de reconsiderar a possibilidade de que as populações amostradas façam parte de um “cline”. Isto é, a frequência dos alelos envolvidos nestas análises estaria sujeita a flutuações de um local para outro, de maneira dosada pela amplitude do fluxo gênico ao longo do “cline”, o que explicaria a maior divergência entre a população de Manaus, no extremo Oeste e as outras que estão no extremo Leste, já que as medidas de diferenciação são essencialmente realizadas assumindo a diferenças existentes entre as frequências nos alelos envolvidos nas análises (Gregorius, 1987). A ocorrência de marcadores específicos para a população de Manaus e para as populações de Maués e Parintins (Figura 2) suporta esta análise.

### **3.5.Conclusões**

- 1- Foi possível detectar um padrão de estruturação, em “cline”, das populações de Pau - rosa avaliadas, o que pôde ser explicado pela interação entre índices de fluxo gênico e de distâncias geográficas.
- 2- Há altos índices de diversidade genética nas populações naturais de Pau – rosa amostradas em Maués, Manaus, Parintins e Silves.
- 3- A população da Reserva Ducke em Manaus é mais diversa que as outras, o que pode estar associado ao fato desta área estar protegida de exploração há 40 anos.

#### 4.Considerações finais

Análises genéticas de populações podem ter implicações diretas nas medidas a serem adotadas para o manejo de espécies, sobretudo as ameaçadas de extinção. No caso das arbóreas tropicais, a definição das taxas de cruzamento, sistemas reprodutivo, fluxo gênico e diversidade genética são parâmetros básicos para os programas de manejo e conservação.

Por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção, sobre a qual se dispõe de poucos dados, o Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) merece atenção. Infelizmente, não se pode fazer comparações entre os dados apresentados aqui e dados oriundos de uma população em estado nativo, já que atualmente, é extremamente difícil encontrar populações de Pau-rosa intocadas. Isto seria o ideal para termos uma melhor e mais direta noção dos impactos da exploração na diversidade genética.

Ainda assim, algumas considerações podem ser formuladas a partir dos dados aqui gerados. Para a população da Reserva Florestal Adolpho Ducke, os dados indicaram uma ligeira redução da diversidade nas plantas juvenis - geração de regenerantes, especialmente para as plantas agrupadas do lado Oeste, nos baixios da Reserva, o que se sugere estar associado a um processo de endemização (Capítulo 2). Por outro lado, todos os índices apontam para altos valores de diversidade quando comparados com índices apresentados para outras espécies. Quando comparados os índices de diversidade estimados para as populações de Manaus, Maués, Silves e Parintins, para a população de Manaus foi encontrado os maiores índices de diversidade (Capítulo 3). Tomando em conjunto os resultados, admitiu-se que foi detectada tendência à redução da diversidade, que poderá ser perpetuada ao longo do tempo e que isto é consequência do processo de exploração que a espécie sofreu desde do início do século passado. A Reserva Ducke foi declarada área de proteção há 40 anos mas foi também intensamente explorada nas décadas anteriores. Não é difícil considerar que a perda de diversidade teria sido maior se o processo de exploração tivesse persistido.

As características reprodutivas (dioicia associada à protoginia) e de dispersão do pólen (associada a pequenos insetos) e de sementes (associada à atividade dos pássaros, principalmente tucanos) têm sido, pelos registros da literatura, associadas aos índices de diversidade relativamente altos encontrados para o Pau-rosa. Os resultados deste trabalho permitem admitir que a alteração das relações ecológicas entre a planta e os dispersores, também em consequência da exploração, são variáveis indispensáveis para compreender a estrutura atual das populações analisadas.

Confirma-se o valor da Reserva Ducke como área mantenedora de diversidade e de estudo, fonte de dados úteis para o desenvolvimento de sistemas de manejo florestal sustentável em Pau – rosa.

Sugere-se, para o futuro, que populações de Pau-rosa em outras localidades da Amazônia sejam amostradas e submetidas à análise de diversidade seja com o marcador molecular RAPD – que gerou informação suficiente para a realização deste trabalho – seja com outros, como microssatélites, para que os dados sejam somados e algumas das perguntas e hipóteses que permanecem ao fim do período deste estudo, como a existência dos clines, sejam respondidas e testadas.

## 5. Referências bibliográficas

- Almeida, C.A.S.; Bomvicino, C.R.; Lachtermacher, M.; Moreira, M.A.M.; Renata, O.; Deuáñez, H.N. 2001. Técnicas de avaliação da diversidade genética. In: Garay, I. & Dias, B. (Eds.) *Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais*. Editora vozes. 430 p.
- Amaral, I.L.; Matos, F.D.; Lima, J. 2000. Composição florística e parâmetros estruturais de um hectare de floresta densa de terra firme no Rio Uatumã, Amazônia, Brasil. *Acta Amazônica*, 30(3): p377 – 392.
- Araújo, V.C.; Correa, R.G.C.; Maia, J.G.S.; Silva, M.L.; Gottlieb, O.R.; Marx, M.C.; Magalhães, . 1971. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. *Acta amazonica*, V.1. n. 3. p45 – 47.
- Barbujani, G. 1987. Autocorrelation of gene frequencies under isolation by distances. *Genetics* 117, 777 -782.
- Bawa, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*, 28: 85 – 92.
- Bawa, K.S.; Ashton, P.S.; Nor, S.M. 1990. Reproductive ecology of tropical forest plants: management issues. In: Bawa, K.S.; Hadley, M. (Eds.) *Reproductive ecology of tropical forest plants*. Unesco – Man and Biosphere Series, V 7. 421 p.
- Bawa, K.S.; Bullock, D. R.; Perry, D.R.; Coville, R.E.; Grayum, M.H. 1985. Reproductive biology of lowland rain forest trees. II. Pollination systems. *Amer. J. Bot.* 72 (3): 346 – 356.
- Bossart, L.L. & Prowell, D.P. 1998. Genetic estimatives of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology and Evolution* 13, p202 – 206.

- Buchert, G.P.; Rajora, O.P.; Hood, J.V. 1997. Effects of harvesting on genetic diversity in Old-growth Eastern White Pine in Ontario, Canada. *Conservation Biology* 11, 747 – 758.
- Bussel, J.D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petrea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, 8. p. 775 – 789.
- Buza, L.; Young, A.; Thrall, P. 2000. Genetic erosion, inbreeding and reduced fitness in fragmented populations of the endangered tetraploid pea *Swainsona recta*. *Biological Conservation* 93, 177 – 186.
- Campbell, O.W. & Peart, D.R. 2001. High seed dispersal rates in faunally intact tropical rain forest: theoretical and conservation implications. *Ecology Letters*, 4: 491 – 499.
- Cardoso, M.A.; Provan, J. Powell, W.; Ferreira, P.C.G.; De Oliveira, D.E. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). *Molecular Ecology* 7, 601 – 608.
- Chaar, J.S. 2000. *Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie Aniba duckei Kostermans*. Tese de doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Changroon, S. 2001. An integrated molecular population genetic approach for Forest tree conservation and management in Thailand. In: ETFRN – *European Tropical Forest Research Network. News. Biotchnology* N. 34.
- Chase, M.W. & Hills, H.H. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215–220.
- Chemacx. 2003. Disponível em: [http://chemacx.Cambridgesoft.com/chemacx/\\_prod](http://chemacx.Cambridgesoft.com/chemacx/_prod). Acessado em 22 de outubro de 2003.

- Chung, M.G.; Chung, M.Y.; OH, G.S.; Epperson, B.K. 2000. Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericeae* population (Lauraceae). *Heredity*, 85, 490–497.
- Clark, A. G. & Lanigan, C. M. S. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1096–1111.
- Costa, L.G.S.; Ohashi, S.T.; Daniel, O. 1995. Pau –rosa - *Aniba rosaeodora* Ducke. Belém: FCAP. *Serviço de Documentação e Informação*, 15pp.
- Cruz, C.D. 1997. *Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística*, Viçosa, MG: UFV, 442 p.
- Dick, C.W. 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 2391 - 2396
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19: 11 – 15.
- Eduards, K; Johnstone, C.; Thompsons, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleid Acids Res.* 19, pp.1349.
- Epperson, B.K. 1992. Spacial structure of genetic variation within populations of forest tree. *New Forest*, 6: 257 – 278.
- Escuredo, A.; Iriondo, J.M.; Torres, M.E. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation* 113, 351-365.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial restriction data. *Genetics*, 131, 479 – 491.
- Fearnside, P.M. 1999. Biodiversidade nas florestas amazônicas brasileiras: riscos, valores e conservação. *Revista Holos* (Edição especial). Unesp p.33 – 59.

- Ferreira, M.E. 2001. Técnicas e estratégias para caracterização molecular e uso de recursos genéticos. pp 233 – 267. In: Garay, I. & Dias, B.(Eds.) *Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais*. Editora vozes. 430 p.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa – Cenargen, Brasília.. 3ª Ed. 220 p.
- Frankhan, R. 1995. Relationship of genetic variation to population size wildlife. *Conservation Biology* 10, 1500 - 1508.
- Futuyma, D.J. 2002. *Biologia Evolutiva*. 2ª Ed. Ribeirão Preto: FUNPEC – RP. 631 p.
- Gascon, C.; Laurence, W.F.; Lovejoy, T. 2001. Fragmentação florestal e Biodiversidade na Amazônia central. In: Garay, I.; Dias, B.(Eds.). *Conservação da Biodiversidade em ecossistemas florestais*. Editora Vozes, Petrópolis. 430 p.
- Ge, S; Oliveira, G.C.X.; Schaal, B. A.; Gao, L.Z.; Hong, De – Yuan. 1999. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*, 82. 638 – 644.
- Geburek, T. 1997. Isozymes and DNA markers in gene conservation of forest tree. *Biodiversity and Conservation* 6, 1639 – 1654.
- Gibson, J.P & Wheelwright, N.T. 1995. Genetic structure in a population of tropical tree *Ocotea tenera* (Lauraceae): influence of avian seed dispersal. *Oecologia* 10,: 49 – 54.
- Gillies, A.C.M.; Navarro, C.; Jowe, A.J.; Newton, A.C.; Hernández, M.; Wilson, J.; Cornelius, J.P. 1999. Genetic diversity in mesoamerican population of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. *Heredity*, 83, 722 – 732.
- Grainer, A. 1993. The environmental effects of deforestation and logging. p146 – 173. In: Grainer, A.(Ed.) *Controlling tropical deforestation*. Earthscan Publications Ltd, London. 294p.



- Grattapaglia, D. 1997. Pseudo – testcross mapping strategy using RAPD markers. *In:* Micheli, M.R & Bova, R. (Eds.) *Fingerprinting methods based on arbitrarily primer PCR*. Springer Verlag. Berlin. p.201 – 217.
- Gregorius, H.R. 1987. The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theor. Appl. Genet.* 74, p.397 – 401.
- Groom, M.J. 2001. Consequences of subpopulation isolation for pollination, herbivory and population growth in *Clarkia concinna concinna* (Onagraceae). *Biological Conservation*, 100. p.55 –63.
- Haig, S. M. 1998. Molecular contributions for conservation. *Evolution* 79, p413 – 425.
- Hall, P.; Walker, S.; Bawa, K. 1996. Effects of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. *Conservation Biology* 10 (3). p. 757 – 768.
- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W.; Sherman- Broyles, S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. *New Forest* 6: 95 – 124.
- Hartl, D.L.; & Clark, A.G. 1997. *Principles of population genetics*. 3 nd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Heywood, V.H. & Iriondo, J.M.2003. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113, p.321–335.
- IBAMA. 1992. *1ª Portaria N° 37* de 3 de abril de 1992.
- IBGE. 1991. *Geografia do Brasil – Região Norte*. Vol. 3. 308 p.
- Jennings, S.B.; Brown, N.D.; Boshier, D.H.; Whitmore, T.C.; Lopes, J. do C.A. 2001. Ecology provides a pragmatic solution to the maintenance of genetic diversity in sustainable managed tropical rain forest. *Forest Ecology and Management*, 154 p1 – 10.

- Jones, C.J.; Edwards K.J.; Castaglione, S. ; Winfield, M.O. Sala, F.; van de Wiel, C.; Bredemeijer, G.; Vosman, B.; Matthes, M. Daly, A.; Brettschneider, R.; Bettini, P.; Buiatti, M. ; Maestri, E. ; Malcevski, A.; Marmioli ,N.; Aert, R. Volckaert, G.; Rueda, J.; Linacero, R.; Vazquez, A.; Karp,A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* **3**: p381–390.
- Jordano, P & Godoy, J. A. 2000. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus nahaleb*(Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Molecular Ecology*, **9**, 1293–1305.
- Kawaguici, C.B.; Kageyama, P.Y. 2001. Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. *Scientia Forestalis*, **59**, 131 – 143.
- Khanuja, S.P.S.; Shasany, A.K.;Daarokar, M.P.; Kumar,S. 1999.Rapid isolation of DNA from the dry and fresh samples of plants producing larger amounts of secondary metabolites and essential oils by modified CTAB procedures. *Plant Molecular Biology Report*, **17**: 1 – 7.
- King, L.M. & Schaal, B.A. 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution* **43**: p.1117-1119.
- Kodak Digital Science. 1 D Image Analysis Software, Version 3.0. 1999. *Windows User's Manual*. Eastman Kodak Company. Rochester, NY. USA
- Kubizki, K. & Kurz, H. 1984. Sincronized dichogamy and dioecy in Neotropical Lauraceae. *Plant Systematics and Evolution*, v. 147, p.253 – 266.
- Kubitzki, K. & Renner, S. 1982. Lauraceae I (*Aniba* and *Aiouea*). *Flora Neotropica*, Monograph number 31. The New York Botanical Gardem. New York.
- Lacy, R. C. 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interactions of drift, mutation, immigration, and selection and population subdivision. *Conservation Biology* **1**, p.143 – 158.

- Lande, R. & Shannon, S. 1996. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50 (1), 434 – 437.
- Laurance, W.F.; Cochrane, M.A.; Bergen, S.; Fearnside, P.M.; Delamônica, P.; Barber, C.; D'angelo, S.; Fernandes, T. 2001. The Future of the Brazilian Amazon. *Science* 291: 438-439.
- Ledig, F.T. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63:1; 87–108p.
- Lee, C.T.; Wickneswari, R.; Muhani, M.C.; Zakri, A.H. 2002. Effect of selective logging on the genetic diversity of *Scaphium macropodum*. *Biological Conservation* 104 p.107 – 118.
- Leite, A.M.C.; Sampaio, P.T.B.; Barbosa, A.P.; Quisen, R.C. 1999. Diretrizes para o resgate e conservação da variabilidade genética de espécies Amazônicas I – pau rosa. Manaus: *Embrapa Amazônia Ocidental*, 43p. Documento, 6.
- Lemes, M.; Gribel, R.; Proctor, J.; Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology* 12, p.2875–2883.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: p.381 – 398.
- Lindenmayer, D.B.; Margules, C.R.; Botkin, D.B. 2000. Indicators of biodiversity for ecologically sustainable forest management. *Conservation Biology* 14, p.941 – 950.
- Loveless, M.D.; & Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Annual Review of Ecology and Systematics*. v.15, p.65 – 95.
- Loveless, M.D. & Hamrick, J.L. 1987. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. *Rev. Biol. Trop.*, 35 (Supl. 1): p.165 – 175.

- Lowe, A.; Bandou, E.; Breyne, P.; Caron, H.; Cavars, S.; Colpaert, N.; Degen, B.; Gribel, R.; Hernandez, M.; Kremer, A.; Labbe, P.; Lemes, M.; Margis, R.; Margis – Pinehiro, M.; Montagu, M.V.; Navarro, C.; Wilson, J. 2001. Assessment of levels and dynamics of intra – specific genetic diversity of Latin American tropical trees for conservation and sustainable management. *In: ETFRN – European Tropical Forest Research Network. News. Biotchnology* N. 34.
- Lynch, M & Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPDS markers. *Molecular Ecology*, 3 p.91 – 99.
- Macdonald, S.E.; Thomas, D.M.; Cherniawsky, D.M; Purdy, B.G. 2001. Managing genetic resources of lodgepole pine in west-central Alberta: patterns of isozyme variation in natural populations and effects of forest management. *Forest Ecology and Management* 152, 45 – 58.
- Magalhães, L.M.S. & Alencar, J.C. 1979. Fenologia do Pau – rosa (*Aniba duckei* Kostermans), Lauraceae, em floresta primária na Amazônia Central. *Acta Amazonica* 9 (2): 227 – 232.
- Manly, B.F.J. 1997. *Randomization Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology*. 2 Ed. Texts in Statistical Science. Chapman & Hall 399 p..
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*, 27. p209 – 220.
- Matocq, M D. & Villablanca, F.X. 2001. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern? *Biological Conservation* 98, p.61 – 68.
- Meunier, J.R. & Grimont P.A.D.1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: p.373–379.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population genetic Analysis (TFPGA), version 1.3, Northern Arizona University.

- Milligan, B.C.; Leebens-Mack, J.; Strand, A.E. 1994. Conservation genetics: beyond maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*,3, 423 –425.
- Mitja, D. & Lescuere, J.P. 2000. Madeira para perfume: qual será o destino do Pau – rosa? In: (Vários autores). *A floresta em jogo. O extrativismo na Amazônia Central*. Ed. Científica. Laure Empereire. Editora UNESP. 234 p.
- Mittermeier, R.A.; Ayres, J.M.; Werner, T.; Fonseca, G.A.B. 1992. O país da Megadiversidade. *Ciência Hoje*,14:p.20 – 27.
- Moraes, P.L.R.; Monteiro, R.; Vencovsky. 1999. Conservação genética de populações de *Cryptocaria moschata* Nees (Lauraceae) na mata atlântica do Estado de São Paulo *Revista Brasileira de Botânica*, V 22. v. 2 (Suplemento). P.237 – 248.
- Mullis, K. & Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55:p.335 – 350.
- Muona, O.; Yazdani, R.; Rudin, D. 1987. Genetic change between life stages in *Pinus sylvestris*: Allozyme variation in seeds and planted seedlings. *Silvae Genetica* 36, 1; p.39 – 42
- Murawski, D.; Gunatilleke, I.A.U.N.; Bawa, K.S. 1994. The effect of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* Dipterocarpaceae from Sri Lanka. *Conservation Biology*. 8, p.997 – 1002.
- Myong, G.; Chung, M.Y.; Oh, G.S. Eppersom, B.K. 2000. Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* population (Lauraceae) *Heredity* 85, 485 497.
- Neale, D.B. 1985. Genetic implications of Shelterwood regeneration of Douglas – fir in Southwest Oregon. *Forest Science* 4, vol 31. p.995 – 1005.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:p.283-292.

- Nei, M.1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:p.583-590.
- Nelson,B.W.;Oliveira,A.A.2001. Área Botânica: Documento Temático Sobre Biodiversidade e Funções Ecológicas Dos Ecossistemas In: Biodiversidade Na Amazônia Brasileira ed.São Paulo : Instituto Socioambiental (ISA) & Editora Estação Liberdade (EEL), p.132-176.
- Nepstad, D.; Macgrath, D.; Alencar, A.; Barros, A.C.;Carvalho, G.; Santilli, M.;Diaz, M.C.V. 2002. Issues in Amazonian Development. *Science* 295, N. 5560, Issue, p.1643-1644.
- Nkongolo, K.K.; Klimaszewsca, K.; Gratton, W.S. 1998. DNA Yields and optimization of RAPD patterns using spruce embryogenic lines, seedlings, and needles. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 1–9.
- Oliveira, A.A. 2000. Inventários quantitativos de árvores em florestas de terra firme: revisão com enfoque na Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica* 30 (4): p.543 – 567.
- Parker, P.G.; Snow, A.A.; Schug, M.D.; Boorton, G.C. Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Evolution* 79 (2), p.361 – 382.
- Péres, T.; Albornoz, J. & Domínguez, A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology* 7, p.1347 – 1357.
- Peterson, A.; Bartish, V.; Peterson, J. 2003. Genetic structure detected in a small population of the endangered plant *Anthericum liliago* (Anthericaceae) by RAPD analysis. *Ecography* 25: p.677 – 684.
- Petit, R.J.;El Mousadik, A.;Pons, O. 1998. Identifying populations for conservation under basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12, 844 – 855.

- Plumptre, A.J. 1995. Importance of 'seed trees' for natural regeneration in tropical forest. *Commonwealth For. Rev.* 74, p.253 – 258.
- Primack, B.; Rodrigues, E. 2002. *Biologia da Conservação*. 3ª Ed.. Londrina. 328p
- Putz, E.F.; Blate, G.M.; Redford, K.H.; Fimbel, R.; Robinson, J. 2001. Tropical forest management and conservation of biodiversity: an overview. *Conservation Biology* 15, p.7 – 20.
- Putz, F.E.;Dykstra, D.P.;Heinrich, R. 2000. Why poor logging practices persist in the tropics. *Conservation Biology* 14, p.951 – 956.
- Quirsen, R.C.; Lopes, A.O.; Santos, R.P.; Angelo, P.C.S. 2003. Otimização de protocolo de extração de DNA de Pau – rosa (*Aniba rosaeodora*). In: *Brazilian Journal of Plant physiology*. (Sulemento) Caderno de Resumos do IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Atibaia – SP.p87.
- Raymond, M. & F. Rousset, 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: p.1280-1283.
- Reed, D. H. & Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: p.230 – 237.
- Ribeiro, J.E.L.S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J.M.; Souza, M.A.D.;Lohrman, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Silva, C.F.; Mesquita, M.; Rocópio, L.C. 1999. *Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. INPA - DFIP.816 p.
- Ritland, K. 1989. Gene diversity and the genetic demography of plant population. In: Brown, A.H.D.;Clegg, M.T.; Kahler, A.L.; Weir, B.S (Eds.). *Plant population genetics, Breeding and genetic Resource*. p.181 – 189. Sinauer, Sunderland, MA.

- Rodrigues, D.P. 2001. *Análise das morfo - raças primitivas de pupunha (Bactris gasipaes Kunth) mantidas no banco ativo de germoplasma com marcadores moleculares RAPDS*. Brasília – UnB. Dissertação de mestrado. 71p.
- Rohlf, F.J. 1990. *NTSYS- PC: Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 1.04. Applied Biostatistics. Steauket, New York.
- Romano, E. 1998. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. In: Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.C. (Eds.). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília, Embrapa – Cenargen.
- Salati, E. & Ferreira, A.M.M. 2000. Forças de transformação do ecossistema Amazônico Brasileiro. In: Salati, E.; Absy, M.L.; Victoria, R.L (Eds). *Amazônia: um ecossistema em transformação*. INPA, Manaus.269p.
- Sampaio, P.T.B. 2000. Pau – rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) In: Clay, W.J.; Sampaio, P.T.B.; Clement, C.R (Eds). *Biodiversidade Amazônica - exemplos e estratégias de utilização*. Sebrae. INPA, Manaus.409p.
- Santana, J.A.S. 2000. Distribuição espacial da regeneração natural de *Aniba rosaeodora* (Pau – rosa). *Rev. Ciênc. Agrár.*, Belém, n. 33, p. 37 – 48.
- Savolainen, O. & Karkkainen, K. 1992. Effect of forest management on gene pools. *New Forest* 6: 329 – 345.
- Savolainen, O. & Kuittinen H. 2000. Small Population process. In: Young, A.; Boshier, D.; Boyler, T. (Ed.). *Forest Conservation genetics: principles and practices*. CABI Publishing, Australia. 352p.
- Schierenbeck, K.A.; Skupski, M.; Lieberman, D.; Lieberman, M. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology*. 6, 137 – 144.



- Seoane, C.E.S.; Kegeyama, P.Y.; Sebben, A.M. 2000. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). *Scientia Florestalis* 57, 123 – 139.
- Skroch P. & Nienhuis J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distances. *Theor Appl Genet* 91: 1086–1091 (1995).
- Slatkin, M.; Barton, N.H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average of gene flow. *Evolution*. 43, 1349 – 1346.
- Spironello, W.R.; Sampaio, P.T.B.; Vieira, G.; Barbosa, A.P. Ecologia reprodutiva do Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae) em uma mata de terra-firme na Amazônia. In: Higuchi, N.; Santos, J.; Sampaio, P.T.B.; Marenco, R.A.; Ferraz, J.; Sales, P.C.; Saito, M.; Matsumoto, S. (Orgs.). Projeto Jacaranda Fase II: Pesquisas Florestais na Amazônia Central. Manaus:INPA, p.69-88.
- SUDAM. 1972. O extrativismo do Pau – rosa (*Aniba Duckei*, Kostem – *A. rosaeodora*, Duckei): Aspectos sócio – econômicos a silvicultura da espécie. *SUDAM, doc.amaz.* (Belém) 3 (1/4): 5 – 55.
- Tsu-Liang C , Ming-Te; Chien-An; Iou-Zen. 2003. Genetic diversity analysis of Taiwan avocado accessions. In: *Proceedings V World Avocado Congress* (Actas V Congreso Mundial del Aguacate). p. 55-59.
- Vasconcelos, G.M.P. 2002. *Diversidade genética de Myrciaria floribunda* (West ex Willdnow) Berg (Cambuí) em paisagem fragmentada da Serra da Mantiqueira. Dissertação de mestrado. Esalq, 84p.
- Vial –Debas. C. 2000. Da tora ao linalol: uma interface economia – ecologia. p. 183 – 190. In: (Vários autores). *A floresta em jogo. O extrativismo na Amazônia Central*. Ed. Científica. Laure Empereire. Editora UNESP. 234 p.

- Wauhg, R. 1997. RAPD Analysis: Use for genoma characterizations, tagging traits and mapping. In: Clark, MS. (Ed.). *Plant Molecular Biology: a laboratory manual*. Belim. Speinger – Verlag,. p. 305 - 333.
- Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II*. Sinauer, Sunderland, MA
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolff, K.; Meyer, W. 1995. *DNA Fingerprinting in plants and fungi*. Boca Raton: CRC Press.
- Welsh, J. & McClland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213 – 7218.
- Wheelwright, N.T. 1993. Fruit size in a tropical tree species: variation, preference by birds, and heritability. *Vegetatio*. v. 107-108. p. 163-174.
- Whitmore, T.C. 1998. *An introduction a tropical rain forest*. 2 Ed. Oxford University Press. New York –USA. 282 p.
- Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, L.A.; Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplifies by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 – 3535.
- Wilson, E.O. 1988. The state of biological diversity. In: Wilson, E.O. (Ed.). *Biodiversity*. National Acadêmic Press. Washington, D.C. 521p.
- Yahoo notícias. 2003. Disponível em: [www.yahoo.com.br/](http://www.yahoo.com.br/) agência yahoo de notícias. Acessado em: 4 de abril de 2003.
- Yazdani, R.; Muona, O.; Rudin, D.; Szmidt, A.E. Genetic structure of a *Pinus sylvestris* L. seed – tree stand and naturally regenerated understory. *Forest Science*, vol. 31, n. 2, p430 – 436.

- Yeh, F. C.; Yang, R.; Boyle, T. 1999. *POPGENE*: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis: version 1.3: manual. Edmonton: University of Alberta, 1999. 29 p.
- Young, A.; Boyle, T.; Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plant. *Trends in Ecology and Evolution*, 11. 413 – 416.
- Yu, K.; Pauls, K.P. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl Acids Res* 20: 2606.
- Zhang, D.X. & Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12, 563 – 584.