

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

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

Ronaldo Pereira Santos

Manaus, 2004

973931

7a

2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
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
Co-orientadora: Dra. Paula Cristina da Silva Angelo

Fontes Financiadoras:

Convênio 086/ 1 MMA/FNMA

Processo N^o 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 convênio INPA/UFAM, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, área de concentração em Ciências de Florestas Tropicais.

Manaus – Amazonas
2004

T
684 973 931
5237a
ex 2



FICHA CATALOGRÁFICA

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

Dissertação de Mestrado

81 p. il.

1. *Aniba rosaeodora* 2. Diversidade genética 3. Marcador molecular 4. Genética de populações

Sinopse:

A distribuição da variabilidade genética foi avaliada em plantas adultas e regenerantes de Pau-rosa, assim como em função da disposição espacial das plantas na Reserva Florestal Ducke. Complementarmente, quatro populações oriundas de municípios do Estado do Amazonas foram avaliadas quanto à diversidade e diferenciação genética.

Palavras chaves: *Aniba rosaeodora*, diversidade genética, AMOVA, RAPD, marcador molecular, genética de populações.

Key words: *Aniba rosaeodora*, genetic diversity, AMOVA, 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;

Aos meus muitos irmãos; caminhei e caminho pensando em vocês também;

Aos 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 e à própria Fundação Ford pela visão na formação de lideranças e justiça social, obrigado pelas oportunidades de que me deu de chegar mais longe;

A Embrapa Amazônia Ocidental, pelo espaço e infra-estrutura e especial a Augusta (Biblioteca) pelas dezenas de *papers*; a Paula Cristina, minha co-orientadora, pela paciência e ensinamentos científicos, ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, Jéferson, Cristiane e Socorro, não poderia esquecer de vocês; Regina Quirsén, pelo espaço no Laboratório e acesso a tudo que foi necessário, incluindo as amostras do projeto PRODETAB conduzido pela Dr. Ângela Leite, à época pesquisadora da Embrapa – Cpa.

Aos ajudantes de campo que fundamentais na coleta das amostras José Edmilson da Costa Souza e Alberto Fialho Neves (“Cunha”).

Aos constantes conselheiros: Dr. Charles Clement, sua orientada Doriane Picanço e Wilson Spironello pelos várias orientações e recomendações.

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.....	9
Resumo	10
Abstract	11
Introdução geral	12
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.....	19
1.1. Introdução	19
1.2. Material e métodos	20
1.3. Resultados e discussão	25
1.4. Conclusões.....	31
Capítulo 2. Análise da diversidade genética em duas gerações de Pau-rosa (<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke) da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus, Amazonas).....	32
2.1. Introdução	32
2.3. Material e métodos	34
2.3. Resultados	38
2.4. Discussão	43
2.5. Conclusões	46
Capítulo 3. Estimativas da diversidade e divergência entre quatro populações naturais de Pau-rosa (<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke) utilizando marcadores RAPD.....	47
3.1. Introdução	47
3.4. Material e métodos	49
3.3. Resultados	52
3.4. Discussão	57
3.5. Conclusões	62
4. Considerações Finais	63
5. Referências bibliográficas	65

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1.

- Figura 1.** Resultado de eletroforese, em gel de agarose a 1,0%, de ácidos nucleicos extraídos de folhas de dois indivíduos 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. As amostras não foram tratadas com RNase **A** - Protocolo Edwards *et al.* (1991). **B** - Khanuja *et al.* (1999). **C** Doyle & Doyle (1987). **M** - λ /HindIII 1,0 μ g (Gibco BRL).....25
- Figura 2.** Reações RAPD em uma amostra de Pau-rosa com um “primer” (P50 ‘5-ACGGCGTATG-3’ onde variou-se a concentrações de: DNA (1 a 5); Taq (6 a 10); MgCl₂ (11 a15); dNTPs (16 a 20) e “primer” (21 a 25). M = marcador lambda Hind III fragmentado.....27
- Figura 3.** Resultados de eletroforese de ensaios RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), onde: **A** - reações em que não foi adicionada BSA. **B** - reações em que foi adicionada BSA, concentração de 0,1%. A seqüência do “primer” P50 5’-ACG GCG TAT G-3’. **M** - /HindIII.....27
- Figura 4.** Eletroforese de RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em que foi testada a reprodutibilidade individual por banda. Utilizou-se as mesmas condições em duas PCRs (**A** e **B**). Os números identificam os indivíduos e as letras **a** até **m** identificam bandas. A reprodutibilidade por banda está indicado na Tabela 2. **M** - λ /HindIII.....28

Capítulo 2.

- Figura 1.** Distribuição de plantas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus/AM. A área hachurada equívale a um platô central de maior cota. O símbolo  representa as adultas que apresentaram plantas juvenis sob a copa ;  são as demais plantas adultas. Plantas marcadas com a letra “A” (Grupo 1, agrupadas) e “B” componentes do Grupo 2 mais dispersas.....35
- 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.39
- Figura 3.** Agrupamento de 99 plantas de Pau – rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) adultas e regenerantes com distância de Jaccard pelo algoritmo UPGMA. A letra “A” representa as plantas do grupo 1 (Agrupadas) e “B” as do grupo 2 (Dispersas) sendo que letras e números são as regenerantes.....41

Figura 4. Representação bidimensional da Análise de Componentes Principais (PCA) entre as plantas adultas e regenerantes de dois grupos (Agrupadas e Dispersas) da Reserva Ducke. As plantas dentro dos círculos são as adultas.. A percentagem de variabilidade explicada pelos eixos: PC1 36,06% e PC2 5,33%. Cada grupo é apresentado em figuras separadas para facilitar visualização.....42

Capítulo 3.

Figura 1. Localização das populações amostradas de Pau-rosa. A-Reserva Ducke (Manaus); B-Silves; C-Maués e D- Parintins. Fonte: GISLAB – INPA (Landsat TM).....51

Figura 2. Padrão eletroforético de bandas RAPD-PCR do “primer” P22 em amostras de quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): 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.....53

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 percentagem de locos que dá suporte a análise com base na análise de locos RAPD.54

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 método de agrupamento UPGMA...55

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%.....56

Figura 6. Diversidade genética acumulada de Nei (1973) em função do número de amostras em quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). O valor de diversidade de Nei equivale a 10 vezes o seu valor real.....56

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1.

Tabela 1 . Seqüência dos “Primers” testados na análise de repetibilidade de bandas RAPD para plantas de Pau – rosa. “Primers” sintetizados por Gibco BRL.....23

Tabela 2. Frequência e o grau de reprodutibilidade de bandas geradas por RAPD – PCR no “primer” 4829

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 número de bandas totais e polimórficas, percentagem de polimorfismo e tamanho da maior e menor bandas geradas por cada “primer”.38

Tabela 2. AMOVA de dados RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) onde quatro níveis são avaliados. Duas gerações de plantas adultas e regenerantes e dois modelos de distribuição geográfica (Dispersas e Agrupadas) da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas.....39

Capítulo 3.

Tabela 1. AMOVA de dados RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) onde avaliou-se a distribuição da diversidade entre e dentro das quatro populações. Testou-se ainda a distribuição da diversidade dentro de dois grupos (margens esquerda – Manaus e Silves) e margem direita – Maués e Parintins) do Rio Amazonas.....52

Tabela 2. Matriz de distâncias geográficas em km (DG) e fluxos gênicos (Nm) (número de migrantes por geração) para quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).....53

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae), espécie submetida à exploração predatória na Amazônia Central, onde se objetivou: (i) definir e padronizar métodos 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 de plantas (adultas e regenerantes) e, ao mesmo tempo, observar a estruturação da diversidade em função de dois grupos com diferente distribuição espacial na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM), e (iii) estimar a diversidade genética e a diferenciação em quatro populações naturais encontradas em Maués, Parintins, Manaus e Silves. Bandas com reprodutibilidade menor que 80% foram excluídas. Nove "primers" geraram 71 bandas, sendo 55 polimórficas (77,46%). A AMOVA mostrou uma pequena, mas significativa diferença de diversidade entre as duas gerações (5,45%; $p < 0,0001$), sendo maior na geração de plantas regenerantes. O restante da diversidade ocorreu dentro das gerações (94,55%). A disposição dos dois grupos não alterou o padrão de distribuição da diversidade genética. Os valores de diversidade, os padrões de agrupamento das adultas e regenerantes (dendrograma e PCA) fizeram com que haja a suposição de grande influência dos pássaros dispersores das sementes de Pau-rosa na estrutura populacional da Reserva. Para quatro populações naturais localizadas em Silves, Maués, Parintins e Manaus (Reserva), quatro "primers" geraram 35 bandas sendo 32 polimórficas (91,42%). Pelos resultados da AMOVA a diversidade está concentrada dentro das populações (76,59%; $p < 0,0001$) com altos índices de diversidade (polimorfismo de 88,57 a 97,44%), condizentes com os dados para outras espécies tropicais arbóreas. A mesma análise indicou que o Rio Amazonas influenciou na distribuição da diversidade em 13,81% ($p < 0,0001$) entre dois grupos de cada lado do rio. 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 teste exato de Fisher 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 $r = -0,95$ ($p = 0,06$) e entre os índices de fluxo gênico e distâncias geográficas $r = -0,78$ ($p = 0,12$), 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.

ABSTRACT

This study was carried with Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae), a severely exploited Amazonian 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) and observe the distribution of variability within and between two groups with different geographic distributions (clustered plants in a quite lower place and a dispersed plants in plateau areas) within the Adolpho Ducke Forest Reserve (Manaus, Amazonas, Brazil) and (iii) to estimate genetic diversity and differentiation for natural populations located in Manaus, Silves, Maués and Parintins (Amazonas State, Brazil). All bands with reproducibility below 80% were excluded. RAPD reactions generated 71 fragments of which 55 were polymorphics (77.46%). AMOVA analysis showed a small but significant different in the genetic variation between the generations (5.45%; $p < 0.0001$), with higher variation within of the juvenile stage. No genetic diversity pattern was detected under distributions of groups. The diversity index (polymorphism), clustering of mature and juvenile plants (showed by dendrogram and bidimensional PCA) were considered to support the hypothesis of the indispensability of birds as Rosewood seed dispersers and tiny insects as pollen vectors in the Reserve. In plants from Manaus, Silves, Parintins and Maués population's four primers produced 35 bands of which 32 were polymorphics (91.42%). The greatest fraction of genetic diversity was detected within populations by AMOVA (76.59%; $p < 0.0001$) and the percentage of polymorphic loci ranged from 88.57% to 97.14%. Similar results have been found for other tropical tree species. According to AMOVA results indicated the influence of Amazonas River as a barrier on the gene flow between groups in each site of river (13.81%; $p < 0.0001$). The population in Manaus presented higher diversity than the other ones. This may be due to cessation of the exploitation process at the Reserve 40 years ago, which did not occurred for the other populations. The Exact test pointed out significant differences in distribution of RAPD markers among populations ($p = 0.05$). The Mantel test for correlations between the genetic and geographic distance measurements was $r = - 0.95$ ($p = 0.06$) and between the gene flow and geographic distance was $r = - 0.78$ ($p = 0.27$) indicating the existence of a structured model, probably in clines, to explain population diversification. Even though classified as a species in risk of extinction, genetic diversity was relatively high in Rosewood.

Introdução geral

Genética e diversidade de espécies tropicais

A riqueza biológica encontrada na região tropical 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).

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 (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 e entre 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). Já a estrutura genética se define como a quantidade de variação de origem genética numa população de uma espécie, e a forma pela qual essa variação se distribui dentro da população. A estrutura espacial é o processo de multiplicação e movimento de genes que alteram sua distribuição espacial, durante cada período reprodutivo (Loveless & Hamrick, 1987).

Considerando sua importância na genética de populações, 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; Ellstrand, 1992; Storfer, 1999). Outra característica importante das espécies

florestais é a baixa densidade, que interfere diretamente no padrão de distribuição da diversidade dentro e entre as populações. Em algumas espécies tropicais ocorre um ou menos de um indivíduo em período reprodutivo por hectare, o que tem sido mostrado, por exemplo, em vários inventários florísticos na Amazônia Central (Amaral *et al.*, 2000; Oliveira, 2000).

Estudos têm mostrado através de dados estimados, que um número grande de espécies nas florestas tropicais são auto – incompatíveis e que aproximadamente 23 % dessas são dióicas. Além disso, boa parte das espécies tem polinização controlada por insetos (Bawa *et al.*, 1985). E alta taxa de polinização cruzada também tem sido identificada nas espécies já estudadas (Bawa, 1974).

Portanto, o conhecimento da variação genética em populações naturais é pré-requisito fundamental para entender o impacto das práticas de manejo e para desenvolver um programa para a conservação de genes em ecossistemas florestais (Bawa *et al.*, 1990; Milligan *et al.*, 1994; Haig, 1998; Luikart *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 1998; Changtroon *et al.*, 2001; Macdonald *et al.*, 2001; Zhang & Hewitt, 2003). Nesta linha, os dados de diversidade de muitas espécies tropicais arbóreas, ao nível populacional tem sido, nos últimos anos, acessados por técnicas moleculares (Geburek, 1997; Cardoso *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1998; Bussel, 1999; Lowe *et al.*, 2001; Dick *et al.*, 2003), o que tem contribuído muito para o entendimento dos processos que são causas da diversidade.

Marcadores moleculares na análise de genética de populações

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 com base no polimorfismo do DNA fornecem a melhor base para a estimativa da diversidade genética (Whaug, 1997), o que tem sido largamente feito por meio dos marcadores moleculares.

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e minissatélites ou locos VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized

Amplified Regions”); SSR (“Simple Sequence Repeats”) Microssatélite e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (Milach, 2002).

As técnicas moleculares avançaram, sobretudo com o 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” ou iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Dentre as técnicas moleculares citadas, uma das mais utilizadas e bem sucedidas são os microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”). São pequenas seqüências de um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidos em seqüência e amplamente distribuídos dentro do genoma de todos os organismos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Li *et al.*, 2002). Por serem altamente polimórficos, multialélicos e co-dominante (ambos os alelos são visualizados), passou a ser amplamente utilizado nos mais variados tipos de estudos envolvendo genética de populações (Al-Rabad’ah *et al.*, 2001; Olsen & Schaal, 2001; Lemes *et al.*, 2003; Ashworth *et al.*, 2004; Zenga *et al.*, 2004). Evolutivamente estes marcadores se encontram distribuídos de maneira não aleatório nos genomas, sendo que sua grande maioria associada a regiões não codificantes de genes. Embora pouco ainda se tem de certeza sobre suas funções (Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004). Apesar das indiscutíveis vantagens, o desenvolvimento de microssatélites demanda trabalho e estrutura laboratorial mais complexos, o que onera a técnica e demanda outros marcadores que sejam mais baratos e de rápida execução.

Neste contexto que se torna importante o marcador RAPD. Baseada no PCR, a técnica RAPD (“Randomly Amplified Polimorphic DNA”) ou DNA polimórfico amplificado ao acaso (Welsh & McClelland, 1990; William *et al.*, 1990) 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 como ocorre nos marcadores ditos co-dominantes como isoenzimas e principalmente microssatélites. 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).

Em função destas desvantagens, 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). Apesar destas considerações, a técnica RAPD tem vantagens ainda muito atrativas para análises genéticas se utilizado com critério, (Lynch & Milligan, 1994; Geburek, 1997; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Bussel, 1999). Se comparado, por exemplo, ao marcador mais utilizado ultimamente (microssatélites) o marcador RAPD é mais simples do ponto de vista de estrutura laboratorial e treinamento de recursos humanos o que o torna mais barato e rápido, possui uma direta transferibilidade dos *primers* entre espécies, não precisa utilizar material radioativo nem desenvolver biblioteca de sondas, assim como não há necessidade do conhecimento prévio das regiões do genoma a serem amplificadas e, por fim, apresentam alto polimorfismo, característica importante para um marcador molecular (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para utilizar o marcador RAPD, 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. Estas correções assumem o equilíbrio de Hardy-Weinberg para uma indireta estimativa das frequências alélicas e assim os demais parâmetros que dependem destas como F_{st} , distância de Nei (1972) e heterozigosidade (H). Os mesmos autores, por outro lado, pontuam que os erros de desvios decorrentes destas aproximações e estimativas podem ocorrer e dependem, entre outras coisas, do número de amostras, sobretudo quando são

realizados estudos de estruturas genéticas com o marcador dominantes. 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). No caso específico dos tratamentos estatísticos e análise da distribuição da diversidade entre e dentro dos mais variados níveis hierárquicos como populações ou grupos ou ainda regiões, basicamente tem sido feita a Análise de Variância Molecular (AMOVA) descrito inicialmente por Excoffier *et al.* (1992) testado por Huff *et al.* (1993) e seguidamente utilizado na maior parte dos trabalhos com este marcador (Yeh *et al.*, 1995; Gillies *et al.*, 1999; Jordano & Godoy, 2000; Reis & Grattapaglia, 2004).

Com todas estas considerações e cuidados, tem-se conseguido bons resultados com este marcador para muitas espécies florestais já estudadas (Huff *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1995; Gillies *et al.* 1997; Cardoso *et al.*, 1998; Bussel, 1999; Mitchell & Riveira, 1998; Gillies *et al.*, 1999; Schierenbeck, *et al.* 1997; Jordano & Godoy, 2000).

Espécie estudada

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, Lauraceae) é uma das mais importantes. 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 ligeiramente maior nas folhas (1,5%) que nos galhos finos (1,3%) e no lenho (1,0%) (Chaar, 2000).

De acordo com Kubitzki & Renner (1982), o centro de diversidade do gênero *Aniba* parece ser os escudos das Guianas, Amazônia Central (região de Manaus) e, num segundo plano, as áreas próximas ao Rio Ucayali e o médio Rio Madeira. A distribuição dessa espécie é ampla na América do Sul, 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 a 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).

O Pau-rosa chega a alcançar até 40 m de altura e seu diâmetro chega a dois metros, 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).

Kubitzki & Kurtz (1984) afirmam que a espécie possui fecundação cruzada. 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 de Pau-rosa na Reserva Adolpho Ducke, em Manaus (Spironello *et al.*, 2003). De uma maneira geral, espécies de Lauraceae participam em 80 % da dieta de alguns Psitacídeos (Ribeiro *et al.*, 1999).

Do ponto de vista econômico, o Pau-rosa é muito importante para a região Amazônica, podendo ser utilizado como madeira para serragem ou extração do óleo essencial. A principal utilização atual é como fonte de óleo essencial, cujo componente principal é o linalol, muito utilizado na indústria de perfumaria e de alto valor comercial. No Estado do Amazonas já chegou a ser o terceiro principal produto na balança comercial (SUDAM, 1972). Atualmente, no mercado mundial, o preço de 100 mL de linalol varia entre 13 até 15 dólares (Chemax, 2003).

Por esse motivo, essa espécie tem sofrido com a exploração predatória e sofre 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 degradação populacional em outras espécies, especialmente de ordem genética, onde se destaca: a redução do número 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). Alguns 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* com perdas em torno de 10% (Hall *et al.*, 1996), 33% de redução no polimorfismo em *Pinus strobus* (Buchert *et al.*, 1997), *Pinus contortata* var. Engelman,

entre 8 e 9% (Macdonald *et al.*, 2000) e em *Scaphium macropodum* (Lee *et al.*, 2001) a redução foi de 31,5%.

No caso do Pau-rosa, pouco ou quase nada se sabe sobre a biologia reprodutiva (taxa de cruzamento e polinizadores), dinâmica ecológica, o padrão genético em populações naturais e muito menos os efeitos da exploração em sua diversidade. 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 e a sua distribuição em uma população natural de Pau-rosa, formada por plantas adultas e juvenis, e distribuída em dois grupos com diferentes organizações espaciais na Reserva Florestal Adolpho Ducke; 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

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 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 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 métodos alternativos de análise dos dados (Clark & 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; 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 (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 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.

1.2. Material e métodos

Material vegetal

Folhas jovens coletadas em dez plantas adultas de Pau-rosa 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 acondicionadas em tubos de polietileno contendo sílica gel (Chase & Hills, 1991). As amostras coletadas da Embrapa foram armazenadas a -20°C , no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus/AM), até extração de DNA. As amostras coletadas na Reserva Ducke permaneceram em temperatura ambiente, nos tubos com sílica, variando de sete a 10 dias, e em seguida foram também mantidas a -20°C .

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), intensificados pela utilização de mais amostras e de três diferentes protocolos: CTAB (Doyle & Doyle, 1987); Edwards *et al.* (1991) e CTAB, modificado por Khanuja *et al.* (1999). Todas as folhas foram lavadas antes de serem pesadas. Cada um destes protocolos está descrito abaixo:

a) **CTAB** (Brometo de cetiltrimetilamônio) - Pesou-se 150 mg de tecido fresco, macerou-se em nitrogênio líquido e adicionou-se 700 μL de tampão de extração (2,0% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris- HCl pH 8,0; 1,0% de PVP (polyvinylpyrrolidone), 0,2% 2-mercaptoetanol). Ressuspendeu-se o tecido no tampão e em seguida incubou-se em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após baixar a temperatura, adicionou-se 600 μL de Clorofórmio: álcool isoamílico (CIA - 24:1) em capela de exaustão e agitou-se os tubos por 5 minutos, invertendo-os até formar-se uma emulsão homogênea. Centrifugou-se a 13000 rpm por 5 minutos. A fase superior (aquosa) foi pipetada para novos tubos. A estes, adicionou-se 50 μL de solução 10% CTAB, 1,4 M NaCl. Misturou-se para homogeneização e adicionou-se 600 μL de CIA. Retirou-se novamente a fase superior para novo tubo. Para precipitar o DNA, adicionou-se 400 μL de isopropanol a -20°C , centrifugou-se a 8000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o "pellet" duas vezes em 1 mL de etanol 70%, sendo 5 minutos cada lavagem. Retirou-se etanol e lavou-se em 1 mL de 95% etanol absoluto por 3 minutos. Retirou-se o etanol e deixou-se o

pellet secar em capela de fluxo laminar. Após bem seco, o “*pellet*” foi dissolvido em 100 μL de TE (tampão de estoque) contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase e incubou-se a 37 °C por uma hora.

b) **Edwards** - Amostras de tecido de folhas jovens foram pesadas (200 mg em cada amostra) e maceradas em nitrogênio líquido. Adicionou-se 600 μL de tampão de extração e macerou-se mais um pouco. Adicionou-se mais 600 μL de CIA (24:1) e agitou-se o tubo para produzir emulsão. Centrifugou-se por 5 minutos a 13000 rpm, pipetou-se a fase superior para um novo tubo. Para a precipitação, acrescentou-se 600 μL de isopropanol e deixou-se à temperatura ambiente por 2 minutos agitando-se levemente para precipitar o DNA. Em seguida, centrifugou-se novamente a 13000 rpm por cinco minutos, descartou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* emborcando os tubos em câmara de fluxo laminar por duas horas. Dissolveu-se o DNA em 100 μL de TE estéril e centrifugou-se mais uma vez por 10 min (13000 rpm). O sobrenadante foi pipetado e colocado em novos tubos. Todas as amostras foram armazenadas a -20° C. O tampão de extração continha: 250 mM NaCl, 200 mM tris - HCl, 25 mM EDTA e 0,5 % de detergente SDS (Dodecil sulfato de sódio).

c) **CTAB, modificado por Khanuja** - Macerou-se o tecido (3 g de tecido fresco) em nitrogênio líquido e transferiu-se o material triturado para tubos Eppendorf 1,5 mL e adicionou-se tampão de extração recém-preparado e misturou-se por inversão. Incubou-se as amostras a 60° C em banho-maria por 30 minutos. Adicionou-se 3 mL de Clorofórmio:álcool isoamílico (CIA-24:1) e misturou-se por inversão durante 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para novo tubo. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de NaCl 5 M e misturou-se bem em vortex. Adicionou-se 0,6 V de isopropanol e deixou em repouso a temperatura ambiente. Após uma hora o DNA que apareceu no fundo do tubo foi retirado e transferido para outro limpo e centrifugado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 80%. Este foi seco em capela de fluxo laminar por 15 minutos e em seguida dissolvido em 0,5 mL de tampão TE com sal elevado. Adicionou-se 5 μL de RNase A e incubou-se a 37° C por 30 minutos. Extraíu-se com igual quantidade de volume de CIA 24:1, transferiu-se a fase aquosa para novo tubo e adicionou-se 2 V de etanol a 4° C. Centrifugou-se novamente a 10000 rpm por 10 minutos. Lavou-se com etanol 80%, secou-se o “*pellet*” a vácuo e dissolveu-se em água estéril. Todas as amostras foram armazenadas a -20° C. Tampão de extração: 100 mM de Tris - HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 1,5 M

NaCl, 2,5% CTAB, 0,2% β - mercaptoetanol (v/v) e 1% PVP (p/v). Tampão TE com sal: 1 M NaCl, 10 mM Tris - HCl (pH 8,0) e 1 mM EDTA.

Os protocolos foram comparados segundo os critérios: a) quantidade e integridade do DNA obtido, avaliada por observação em géis de agarose após eletroforese; b) relação entre as absorbâncias lidas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As leituras de absorbância foram realizadas em aparelho "GeneQuant pro RNA/DNA Calculator" (Amersham Pharmacia Biotech). Foram aplicados 8 μ L da solução de ácidos nucleicos obtidos ao final das preparações em cada poço do gel. A eletroforese foi realizada em mini-géis de agarose 1,5 %, em TBE 1 X, corados com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e as imagens capturadas no 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" (Kodak, 1999).

Aprimoramento das condições da PCR

As soluções de ácidos nucleicos foram diluídas para a concentração de 10 ng/ μ L em água destilada autoclavada e armazenadas a -20°C. Foram testadas variações nas concentrações finais de DNA, MgCl₂, "primers" decâmeros (oligonucleotídeos com 10 nucleotídeos), dNTPs (nucleotídeos) e *Taq* polimerase nas reações de PCR. Manteve-se constantes as outras condições (50 mM de KCl e de 20 mM de Tris-HCl). Para DNA concentrações de 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 MgCl₂ (0, 0,75, 1,50, 2,25 e 3,00 mM), de "primer" (Tabela 1) (0, 125, 250, 375, 500 nM) e dos dNTPs (0, 50, 100, 150, 200 μ M de cada tipo) foram testadas. As reações tiveram volume final de 25 μ L. Os testes foram realizados utilizando o "primer" de sequencia 5'-ACG GCG TAT G-3' e DNA extraído de uma planta e em seguida as melhores concentrações foram testadas em outras 20 plantas. Utilizou-se o termociclador (Perkim Elmer Gene Amp PCR System 2400) programado para 92°C por 1 minuto; 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 por tempo indefinido. Variou-se a temperatura de anelamento em 30 e 35° C.

Fez-se ainda teste com inclusão de BSA ("Bovine Serum Albumine") em dez reações, sendo cinco com BSA (0,1%) e cinco sem BSA. As condições dos outros componentes foram: 30ng, Tampão 1 X, 3,0 U *Taq*, 2,0 mM MgCl₂, 500 nM "primer", 100 μ M cada dNTP.

plantas, o padrão de cada banda foi testado para cada planta, analisando a ocorrência de coincidências (banda presente na primeira e na segunda PCR ou ausente na primeira e na segunda PCR). 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 PCRs (Pérez *et al.*, 1998) foram calculados conforme cada tratamento. A definição dos critérios foi baseada nas experiências de outros trabalhos que utilizavam bandas com valores acima de 80% de reprodutibilidade, como em Schierenbeck *et al.* (1997). Assim tem-se que: **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; **tratamento 2** - apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 90% foram admitidas para o cálculo dos índices de auto-similaridade; **tratamento 3** - apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 80% foram admitidas para o cálculo dos índices de auto-similaridade e **tratamento 4** - apenas bandas com grau de reprodutibilidade acima de 70% foram admitidas para o cálculo dos índices de auto-similaridade. O número de índices de auto-similaridade iguais a 1 foi contado, “primer” por “primer”, e as médias 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-se o programa GENES (Universidade Federal de Viçosa - Cruz, 1997). ANOVA e teste de médias foram realizados utilizando o programa SYSTAT, versão 9.

Matrizes de similaridade (índice de Jaccard) foram geradas pelos dados obtidos nos dois experimentos (duas PCRs). Com os dados referentes a cada tratamento gerou-se novas matrizes de similaridade, sendo duas matrizes para cada tratamento (uma referente a cada PCR). O teste de correlação entre as duas matrizes de similaridade geradas com dados submetidos a cada um dos tratamentos foi realizado através da rotina “MXCOMP” do aplicativo NTSYS - PC, versão 1.60 (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 foram testados e os testes permitiram, também, validar o método utilizado para a coleta e preservação do material vegetal. As folhas, que foram acondicionadas 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. Este tempo, do campo até o laboratório, deveu-se ao fato de que o retorno da excursão se deu após este período. O DNA extraído conforme o protocolo de Edwards *et al.* (1991) foi considerado de melhor qualidade do que o que se verificou pela aplicação do método de Khanuja *et al.* (1999) (Figura 1B).

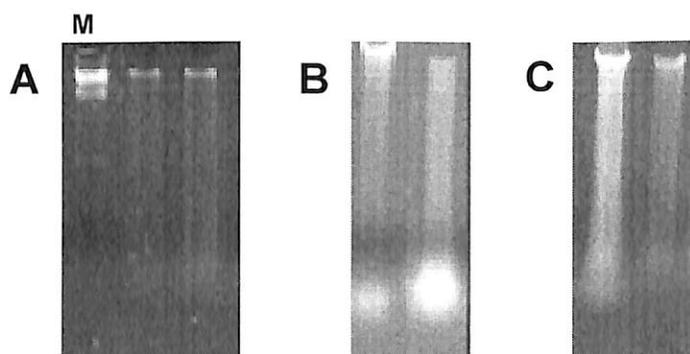


Figura 1. Resultado de eletroforese, em gel de agarose a 1,0%, de ácidos nucleicos extraídos de folhas de dois indivíduos de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) coletadas em tubos de polietileno com grânulos de sílica e armazenadas a -20 °C, até o momento da utilização. As amostras não foram tratadas com RNase. **A** - Protocolo Edwards *et al.* (1991). **B** - Khanuja *et al.* (1999). **C** Doyle & Doyle (1987). **M** - λ /HindIII 1,0 μ g (Gibco BRL).

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. Algumas das amostras tratadas conforme o recomendado por Doyle & Doyle (1987) sofreram perda de qualidade após a extração, ainda que mantidas a -20 °C. Este último efeito não foi verificado para o DNA obtido via aplicação dos outros dois protocolos para a extração de DNA das mesmas plantas. Este não é o que normalmente se observa com o protocolo CTAB (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O protocolo CTAB tem servido para a extração da maioria das espécies vegetais e, apesar dos problemas mostrados com as amostras de Pau-rosa da Reserva Ducke, os testes realizados por Quisen *et al.* (2003) com amostras de outras populações resultaram em extração de DNA de qualidade. Isto sugere que as condições de coleta e armazenamento em cada caso certamente influenciaram nas extrações das amostras da Reserva. Outras vantagens do protocolo Edwards levadas também em consideração, foram: a maior rapidez e simplicidade de extração em laboratório se considerarmos grande número de amostras, além de menor necessidade de reagentes, inclusive RNase (Figura 1) em comparação a Doyle & Doyle (1987).

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 absorbância 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 (com média de 650 ng) 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” decâmero 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 (Figura 2). Estes resultados são semelhantes aos já testados e definidos para *Persea americana* Mill. Lauraceae, exceto para a quantidade de Taq (1,5 U) (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 3). Após a definição das melhores concentrações para cada reagente, outras vinte diferentes amostras de Pau-rosa foram testadas para confirmar o resultado obtido com uma única amostra. Não diferentemente destas amostras, todas as amplificações foram satisfatórias.

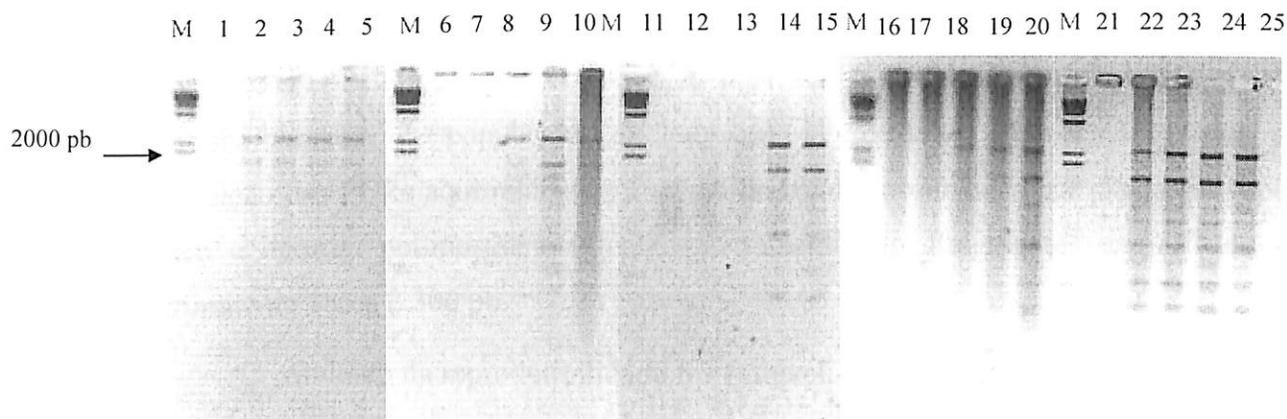


Figura 2. Reações RAPD em amostra de Pau-rosa com um “primer” (P50 ‘5-ACGGCGTATG-3’ onde variou-se a concentrações de: DNA (1 a 5); Taq (6 a 10); MgCl₂ (11 a 15); dNTPs (16 a 20) e “primer” (21 a 25). M = marcador lambda Hind III fragmentado.

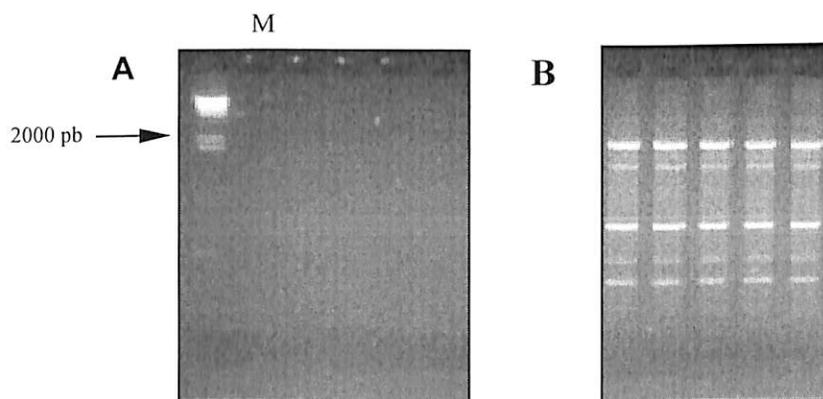


Figura 3. Resultados de eletroforese de ensaios RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), onde **A** - reações em que não foi adicionada BSA. **B** - reações em que foi adicionada BSA, concentração de 0,1%. A seqüência do “primer” P50 5’-ACG GCG TAT G-3’. M - λ /HindIII

Vinte “primers” foram avaliados quanto ao número de bandas RAPD geradas e ao polimorfismo verificado para estas bandas. Apenas onze foram utilizados, já que os demais obtiveram padrões insatisfatórios (poucas bandas ou muito monomórficas). Neste teste, o número médio de bandas produzidas por planta foi de 8,2, sendo 2,7 a média de bandas polimórficas. Embora seja um valor considerado baixo de polimorfismo, deve-se considerar

que foi apenas um teste inicial para saber o poder de detecção de cada “primer” e que apenas quatro plantas foram avaliadas. Isto incrementa as expectativas de aumentar o polimorfismo quando se avaliar um número maior de indivíduos.

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 variabilidade 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. Quanto ao tamanho dos fragmentos amplificados, estes variaram de 185 a 2.300 pb.

O resultado da reprodutibilidade foi variável. No exemplo da Figura 3 e da Tabela 1, houve variação do grau de reprodutibilidade individual de cada banda para um “primer” entre 45 e 100%.

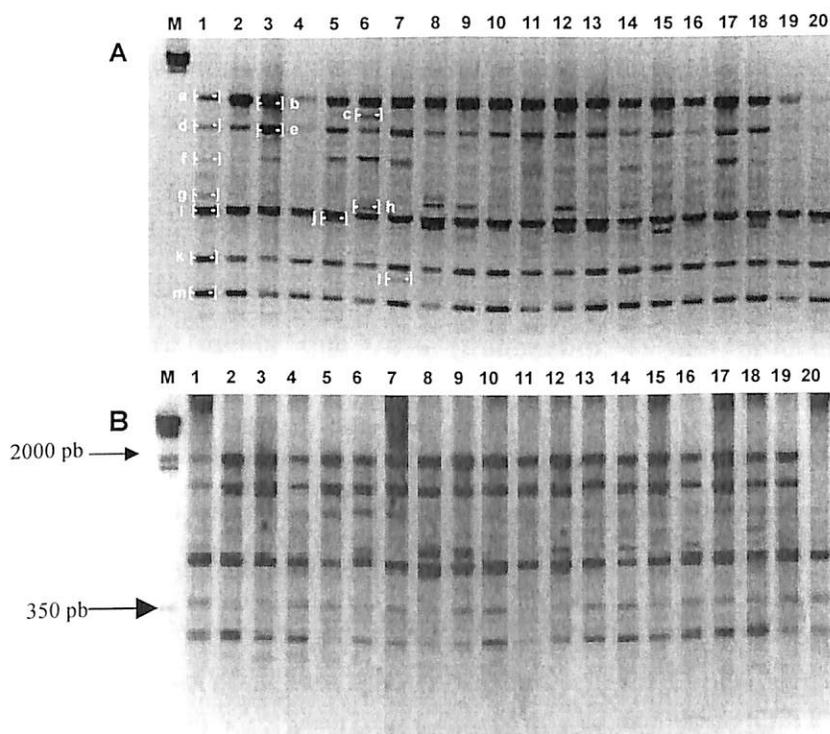


Figura 4. Eletroforese de RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em que foi testada a reprodutibilidade individual por banda. Utilizou-se as mesmas condições em duas PCRs (A e B). Os números identificam os indivíduos e as letras a até m identificam bandas. A reprodutibilidade por banda está indicada na Tabela 2. M - λ /HindIII. “Primer” P48.

Tabela 2. Freqüência e grau de reprodutibilidade de bandas geradas por RAPD – PCR “primer” 48.

bandas	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
Coincidências *	20	19	14	20	9	17	16	15	20	13	20	20	20
Reprodutibilidade **	100	95	70	100	45	85	80	75	100	65	100	100	100

* n°. de vezes em que ocorre coincidência do padrão da banda em ocasiões (A e B na Figura 3) diferentes

** grau de reprodutibilidade: percentagem de vezes em que ocorre coincidência do padrão da banda em 20 chances

O número médio de índices de auto – similaridade igual a um (1) variou em função da admissão ou não de bandas com graus de reprodutibilidade entre 70 e 90%. Houve diferença significativa para este índice detectada pelo teste de Tukey, com probabilidades $\leq 5,8\%$, para os contrastes entre o tratamento 2 e qualquer outro. As médias dos tratamentos 3 e 4 indicaram que a diferença entre estes dois tratamentos foi estatisticamente significativa ($P = 4,2\%$).

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. A eficiência da eliminação de bandas com grau de reprodutibilidade menor que 80% antes do cálculo de índices de similaridade foi detectada sobretudo com relação ao número de bandas. Embora a eliminação de bandas com reprodutibilidade maior que 90% seja o padrão ideal, este retira um número muito elevado de bandas das análises. Já o tratamento com banda acima de 80% aumenta este número, apesar de admitir o uso de bandas menos reproduzíveis. A eliminação de bandas com reprodutibilidade menor que 70% (tratamento 4) não produziu efeito diferente, estatisticamente significante, da não aplicação de critério de seleção de bandas, isto é, utilizar todas as bandas (tratamento 1). Esse padrão de reprodutibilidade na verdade era esperado já que, ao eliminar as bandas com menor repetibilidade individual, elimina-se também a chance da reprodutibilidade ser menor.

A aplicação do teste de correlação entre matrizes (Teste de Mantel) foi eficiente porque permitiu avaliar a eficiência dos critérios de seleção de bandas também sobre índices de similaridade entre cada matriz produzida em cada PCR. O coeficiente de correlação (r) entre matrizes geradas sem a eliminação de bandas (tratamento 1) foi de 0,21 ($P > 10,0\%$), matrizes geradas para o tratamento 2 foram correlacionadas com coeficiente $r = 0,92$ (correlação significativa com $P < 1,0\%$), ao tratamento 3 gerou coeficiente 0,52 ($P = 5,0\%$) e a comparação para o tratamento 4 gerou coeficiente 0,21 ($P > 10,0\%$). A análise de

correlação entre matrizes distribuiu melhor o peso das conclusões. Isto é, não mais apoiadas somente sobre a coincidência dos padrões de bandas RAPD produzidos para oito plantas por "primer", em ocasiões diferentes, ou seja, sobre índices de auto-similaridade, mas também considerando a similaridade existente entre duas matrizes produzidas em ocasiões diferentes.

1.4. Conclusões

1- A geração de bandas RAPD para Pau-rosa é possível quando o material vegetal é coletado em tubos de polietileno com grânulos de sílica gel, armazenados a -20 °C e o DNA é extraído utilizando tampão de extração contendo o detergente SDS com o protocolo Edwards *et al.* (1991).

2- 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 quando se utilizou bandas com reprodutibilidade acima de 90%.

Capítulo 2

Análise da diversidade genética em duas gerações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) da Reserva Ducke (Manaus, Amazonas)

2.1.Introdução

Uma das formas em que a diversidade dentro das espécies se manifesta é na diferenciação genética entre as gerações dentro das populações. Alguns fatores demográficos e genéticos, tais como o fluxo gênico 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 ao longo das gerações.

Apesar destes resultados, Neale (1985) não demonstrou a existência de redução da diversidade genética em cinco estágios de crescimento para *Pseudotsuga menziensis* var. *menziensis* em área manejada. Mesmo assim, a tendência é que ao reduzir artificialmente populações pode haver menor diversidade genética disponível para as gerações subseqüentes (Lacy, 1987; Hartl, & Clark 1989; Ledig, 1992; Murawski *et al.*, 1994; Frankhan, 1995; Young *et al.*, 1996; Savolainen & Kuittinen, 2000; Putz. *et al.*, 2001).

Muitas espécies que tiveram suas populações reduzidas em função da exploração de suas populações naturais poderiam, portanto, apresentar estes efeitos negativos em suas características genéticas. Entre estas se pode destacar o Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae), espécie arbórea que chega a 40 metros de altura (Mitja & Lescure, 2000) e que sofreu intensamente com a exploração, pois uma de suas principais características é o aroma adocicado resultante da presença da essência de linalol em toda a planta (Araújo *et al.*, 1971). Utilizado na indústria de perfumaria, o linalol possui alto valor de mercado

(SUDAM, 1972), onde o preço de catálogo divulgado por fornecedores internacionais varia de US\$13,40 a US\$15,75 para 100 mL de linalol com pureza de 97% e de 118, para 1 g de "DL-linalool" (Chemax, 2003).

Técnicas predatórias, com retirada de toda a árvore do local sem deixar possibilidade de brotamento, têm sido amplamente empregadas. Em função disto, atualmente, o acesso às áreas com populações remanescentes é difícil (SUDAM, 1972) e a espécie é alocada na categoria "em perigo" de extinção (IBAMA, 1992; Vial-Debas, 2000).

Evidências demonstram que 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). A necessidade particular por luz na fase juvenil, associada à alta predação de sementes (Spironello *et al.*, 2003) e à irregularidade da floração e frutificação (Magalhães & Alencar, 1979; Kubitzki & Kurtz, 1984), acarreta em reduzido número de regenerantes (plantas em estado juvenil). A dispersão de frutos e sementes se faz basicamente por meio 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. Sobre polinizadores, grupos de Meliponinae já foram registrados em plantas de Pau-rosa, sobretudo pela compatibilidade de seu tamanho - de 2 a 3 mm de comprimento - com o da flor (Kubitzki & Kurtz, 1984). No entanto, é possível que outros grupos de pequenos insetos, ordem Thysanoptera, atuem como agentes polinizadores (Spironello *et al.*, 2003).

Próxima à cidade de Manaus encontra-se, na área da Reserva Florestal Adolpho Ducke, uma população remanescente representativa de Pau-rosa em termos de número de indivíduos, de acordo com dados de levantamentos florísticos e inventários (Ribeiro *et al.*, 1999; Spironello *et al.*, 2003). Como em outras áreas com Pau-rosa, em intensa exploração no século passado para abastecer as muitas usinas de beneficiamento de linalol existentes na cidade de Manaus (SUDAM, 1972). O modelo de exploração é basicamente a retirada total das plantas sem deixar possibilidade de rebrotação.

Considerando a importância de se verificar a variação na diversidade em diferentes estágios de crescimento, os objetivos deste trabalho foram investigar a diversidade genética entre duas gerações de plantas assim como entre dois diferentes modelos de distribuição espacial das plantas de Pau-rosa na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM).

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 a 26 km da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil, na Rodovia AM – 010 (2° 37' S 60° 11' O). A Reserva tem uma área de 100 km² (10 x 10 km). 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) (Ribeiro *et al.*, 1999).

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. Folhas jovens de 39 plantas adultas e de 60 plantas em fase juvenil (regeneração) foram coletadas em toda a área da reserva sendo que, destas adultas, apenas 18 tinham plantas em fase juvenil (o número de juvenis variou de um a nove em cada planta adulta). A área de coleta foi considerada num raio de aproximadamente de 15 metros sob as copas de cada árvore. As folhas coletadas foram acondicionadas em tubos plásticos, contendo sílica gel e, posteriormente, transportadas até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, onde foram preservadas a -20 °C.

Extração e quantificação de DNA

O método utilizado na extração de DNA foi o de Edwards *et al.* (1991), já descrito no capítulo 1. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria em aparelho GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech). Calibrou-se o espectrofotômetro com água estéril e em seguida tomou-se 20 µL da solução de DNA recém extraídas e diluiu-se em 1880 µL de água estéril em cubeta de 2 mL, onde se fez a leitura a 260 e 280 nm e a quantificação do DNA em ng. Para uniformizar o preparo das reações de amplificação, as soluções de DNA foram diluídas para a concentração de 10 ng/mL, em água destilada autoclavada, e também mantidas a -20 °C.

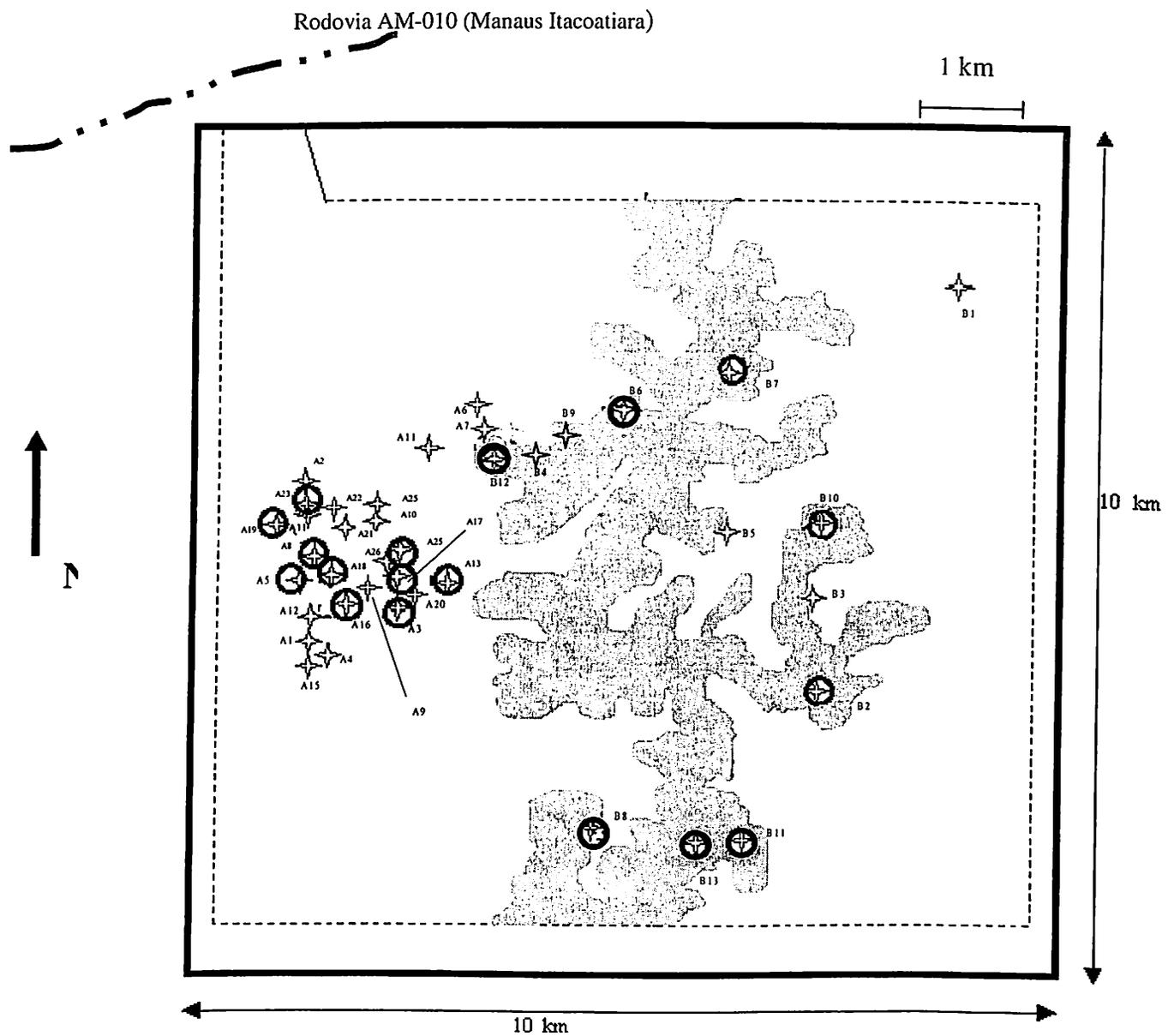


Figura 1. Distribuição de plantas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus/AM. A área hachurada equivale a um platô central de maior cota. O símbolo  representa as adultas que apresentaram plantas juvenis sob a copa ;  são as demais plantas adultas. Plantas marcadas com a letra “A” (Grupo 1, agrupadas) e “B” componentes do Grupo 2 mais dispersas.

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 seqüência arbitrária (Tabela 1). Reações controle foram realizadas com todos os “primers”. Estas reações consistem basicamente de colocar todos os reagentes em um único tubo, exceto o DNA. Assim observou-se a geração ou não de produtos amplificados, verificando a existência de contaminação nas reações. A obtenção das imagens e análises dos dados, assim como a visualização e das bandas, estão descritos no Capítulo 1.

Análises genéticas e estatísticas

Para as análises, utilizou-se apenas as bandas com reprodutibilidade acima de 80%, conforme os testes do Capítulo 1. Calculou-se a porcentagem e o número de locos polimórficos para as duas gerações (plantas adultas e para plantas regenerantes). O programa utilizado foi o POPGENE - versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

A distribuição da diversidade genética foi avaliada de duas formas: entre e dentro as duas gerações e entre e dentro as duas formas de distribuição das plantas dentro da Reserva (Dispersas e Agrupada; Figura 1). Para isto, empregou-se a Análise de Variância Molecular (AMOVA) de acordo com Excoffier *et al.* (1992) utilizando o programa Arlequin versão 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). A matriz Euclidiana de distância genética foi utilizada e a significância dos componentes da variação foi testada com 1000 permutações. Para avaliar a diversidade entre os grupos com diferentes distribuições geográficas, levou-se em conta como as plantas estavam distribuídas na área (Figura 1). No primeiro grupo, as plantas estão mais próximas e numa cota intermediária entre platô e área mais baixa (26 plantas adultas e 25 regenerantes). No outro grupo encontram-se 13 adultas e 35 regenerantes, sendo que estão mais espalhadas e numa cota maior (platô).

Estimou-se ainda o fluxo gênico ou número médio de migrantes por geração (Nm) entre estes dois grupos. O valor de Nm é baseado em estimativas feitas do valor de GST em função dos valores de FST, onde $[Nm = 0,5 (1-GST)/(GST)]$ (Slatkin & Barton, 1989). Este parâmetro foi estimado no programa POPGENE.

Para avaliar o padrão de agrupamento espacial entre as adultas e regenerantes foram feitas duas análises, resultando em duas representações gráficas: 1- dendrograma utilizando-se a distância de Jaccard com o algoritmo UPGMA no programa NTSYS pc v. 1.60 (Rohlf,

1990); e 2- o padrão de relação bidimensional com a Análises de Componentes Principais (PCA), para cada grupo em separado na rotina MXPLOT e também no programa NTSYS.

A correlação entre matrizes de distância geográfica - distâncias 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). Avaliou-se também a existência de diferenças significativas nas frequências das bandas para cada grupo por meio do Teste Exato de Fisher (Raymond & Rousset, 1995). Para estas duas análises implementou-se o programa TFGA (Miller, 1997), com 1000 permutações, considerando as correções sugeridas por Lynch & Milligans (1994) para análises de marcadores dominantes.

2.3.Resultados

Foram geradas 107 bandas no total, sendo que apenas 71 foram utilizadas para as análises considerando o critério de 80% de reprodutibilidade (Capítulo 1). Destas selecionadas, 55 foram polimórficas, o que equivale a 77,46% de polimorfismo (Tabela 1). Pelo fato da grande maioria das bandas eliminadas serem polimórficas, o polimorfismo médio caiu quando passou de um conjunto de 107 bandas (84,11%) para 71 bandas com polimorfismo de 77,46%.

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

“primer”	sequência	nº de bandas			variação em pb
		totais	polimórficas	%	
P4	'5-AAGTCCGCTC-3'	10	8	80,0	470 -1570
P6	'5-CCACGGGAAG-3'	5	5	100,0	485 - 980
P10	'5-TCAGAGCGCC-3'	7	6	85,71	570 -1000
P16	'5-AAGACCCCTG-3'	8	8	100,0	490 -1780
P19	'5-CTTCACCCGA-3'	7	7	100,0	500 -1650
P40	'5-AGCGCCATTG-3'	8	5	62,5	485 -1470
P48	'5-GGCACGCGTT-3'	9	5	55,5	350 -1340
P50	'5-ACGGCGTATG-3'	9	6	66,7	475 -2000
P51	'5-CATCCGTGCT-3'	8	5	62,5	300 -1550
Total		71	55	77,46	

Comparando cada geração, o número e percentagem de locos polimórficos foi maior para as regenerantes. Teve-se 55 locos polimórficos (LP) e 77,46% de polimorfismo nas regenerantes, sendo que nas adultas houve 50 LP equivalente a 70,4% de polimorfismo. Estes números representam um aumento de 9,1% de polimorfismo nas regenerantes.

A análise de variância molecular (AMOVA) mostra a distribuição da diversidade genética entre quatro níveis hierárquicos avaliados: dentro as duas gerações de Pau-rosa e entre e dentro dois padrões de distribuição geográfica das plantas (Tabela 2). A maior parte da diversidade está dentro das gerações (94,55%) e a fração menor se encontra entre as gerações (5,45%). A análise indica também que não há diferença entre a distribuição geográfica, sendo que apenas 1,00% da diversidade pode ser explicada pela distribuição espacial da plantas na Reserva Ducke, o que é não significativo ($p = 0,33$). Dentro de cada

grupo (Dispersa e Agrupada) a diferença de diversidade entre as gerações correspondeu a 2,89% ($p < 0,0001$).

Tabela 2. AMOVA de dados RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) onde quatro níveis são avaliados. Duas gerações de plantas adultas e regenerantes e dois modelos de distribuição geográfica (Dispersas e Agrupadas) da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação	P*
Entre gerações	1	51,658	0,79926	5,45	<0,0001
Dentro das gerações	97	1345,877	13,87502	94,55	<0,0001
Total	98	1397,535	14,67428	-	-
Entre grupos	1	25,284	0,17264	1,00	0,33
Entre gerações.dentro grupos	2	60,168	0,73221	2,89	<0,0001
Dentro dos grupos	95	1312,083	13,81140	96,11	<0,0001
Total	98	1397,535	14,37096	-	-

*Nível de significância das análises

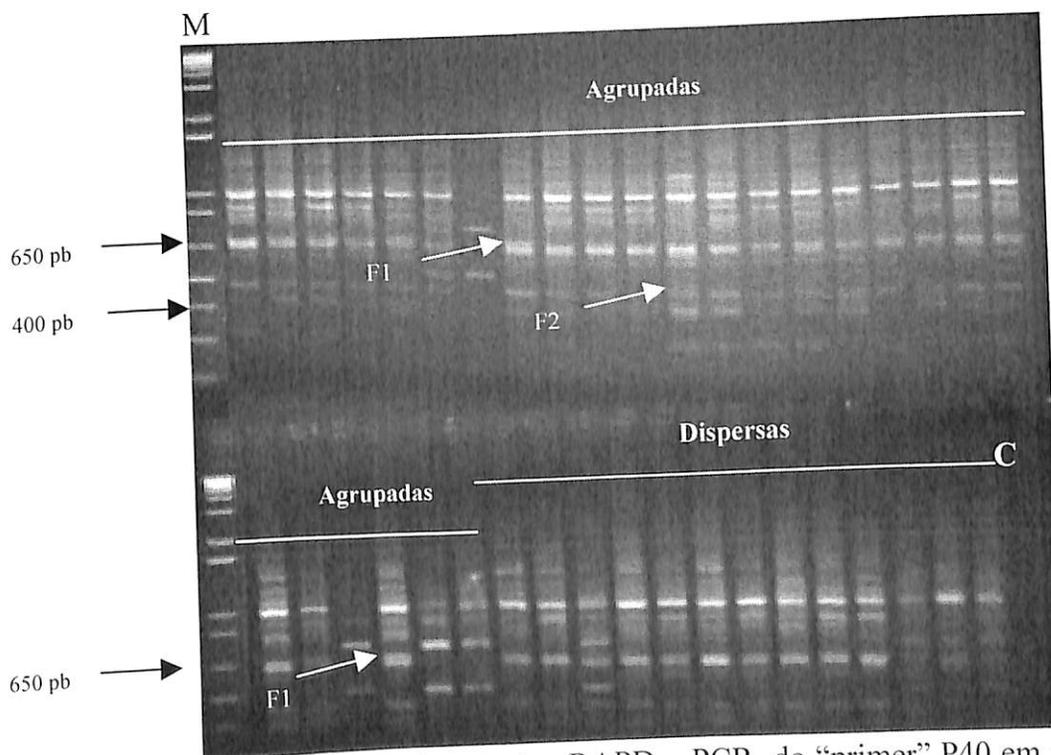


Figura 2. Padrão eletroforético de fragmentos RAPD – PCR do “primer” P40 em plantas adultas de Pau-rosa. As setas destacam dois fragmentos (F1 e F2) presentes apenas em adultas mais agrupadas. M = marcador de peso molecular 1 Kb Ladder Plus e C = reação controle.

A figura 2 mostra a ocorrência de duas bandas encontradas apenas em plantas adultas do grupo mais próximas geograficamente e numa conta menor (Agrupadas). As plantas dispersas não apresentou esta banda. Já quando analisadas todas as bandas quanto as suas frequência em cada grupo considerando também as regenerantes, os resultados do teste exato de Fisher indicaram que não houve diferença significativa quanto à distribuição de bandas ou fragmentos entre grupos (Dispersas e Agrupadas; $p < 0,05$), isto é, não há diferença no padrão de distribuição das frequências das 71 bandas avaliadas para os dois grupos.

O dendrograma gerado a partir do índice de similaridade de Jaccard mostra a formação dos agrupamentos entre todas as plantas adultas e regenerantes (Figura 3). Não houve a formação de grupos supostamente aparentados, isto é, as plantas adultas associadas com as respectivas regenerações. Por outro lado, observa-se claramente que as plantas adultas mostram-se coerente com a distribuição geográfica na Reserva Ducke. As adultas que estão mais agrupadas (no mapa plantas com a letra A) têm maior similaridade também no dendrograma de Jaccard, o que não acontece com as mais dispersas (no mapa letra B) que assim se apresentam mais espalhadas no dendrograma.

As regenerantes tenderam a se agruparam mais entre sim que associadas às adultas, independente de que agrupamento (Agrupadas ou Dispersas). Se considerarmos as plantas adultas que estão mais associadas com regenerantes, uma maior proporção está entre as agrupadas (letras A). Ou seja, mais regenerantes das agrupadas próximas as adultas das agrupadas. Apenas uma planta adulta apresentou-se com algumas de suas regenerantes no mesmo ramo (adultas A8).

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, o índice de correlação foi muito baixo embora significativo ($r = 0,10$; $p = 0,012$), o que significa dizer que o padrão de distribuição da diversidade genética pode ser explicado em parte pelo padrão de distribuição geográfica.

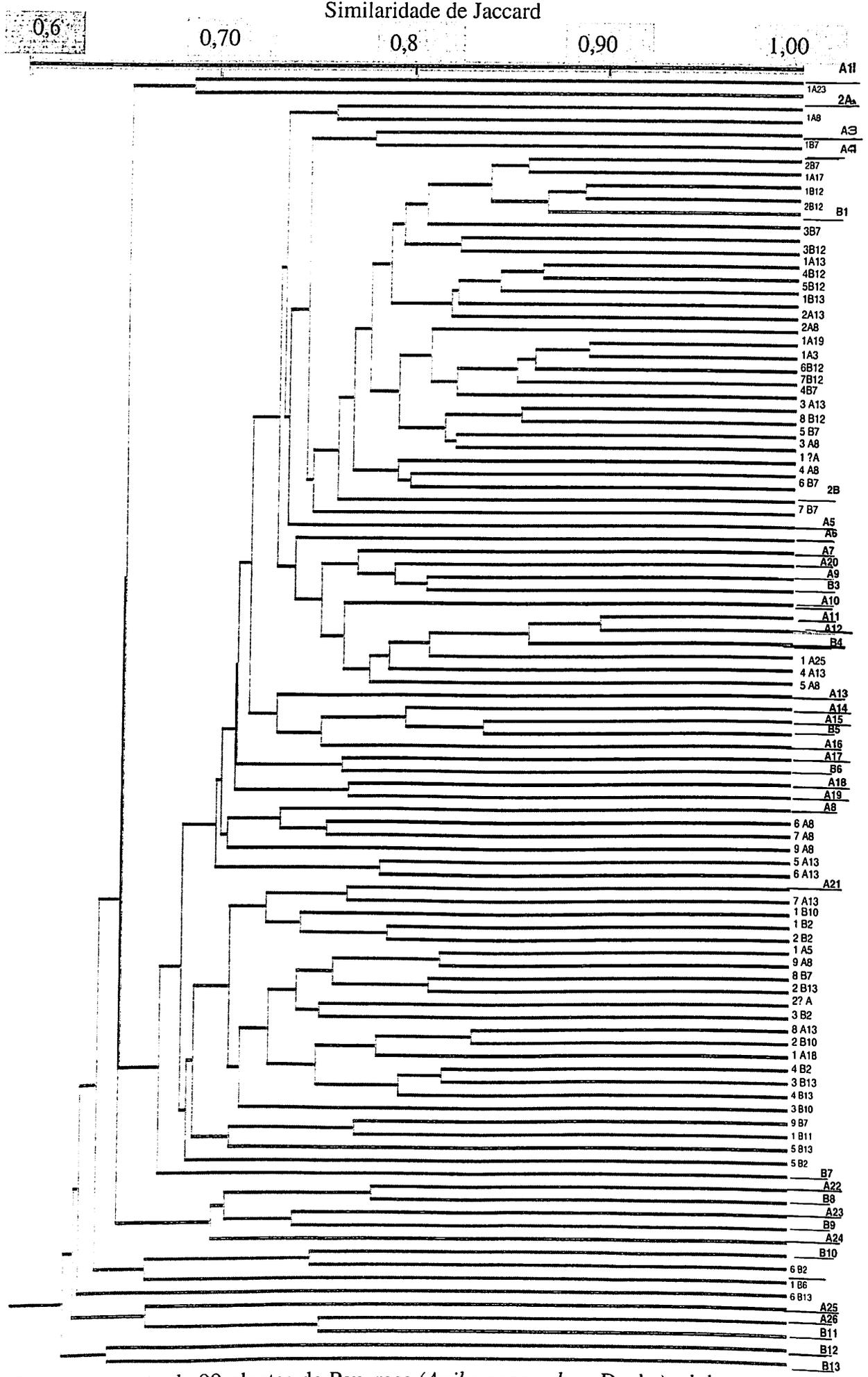


Figura 3. Agrupamento de 99 plantas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) adultas e regenerantes com distância de Jaccard pelo algoritmo UPGMA. A letra "A" representa as plantas do grupo 1 (Agrupadas) e "B" as do grupo 2 (Dispersas) sendo que letras e números são as regenerantes.

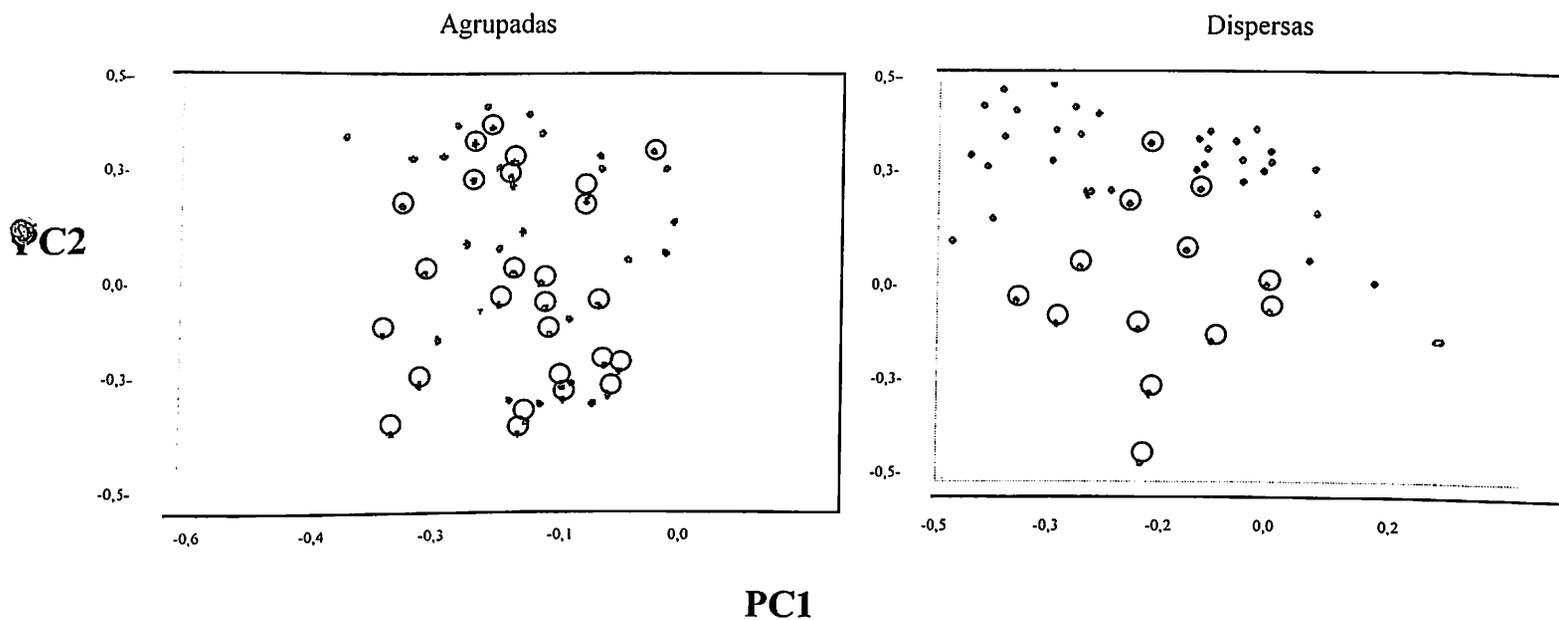


Figura 4. Representação bidimensional da Análise de Componentes Principais (PCA) entre as plantas adultas e regenerantes de dois grupos (Agrupadas e Dispersas) da Reserva Ducke. As plantas dentro dos círculos são as adultas. A percentagem de variabilidade explicada pelos eixos: PC1 36,06% e PC2 5,33%. Cada grupo é apresentado em figuras separadas para facilitar visualização.

O arranjo bidimensional das plantas gerado pela Análise de Componentes Principais (PCA) revelou um maior agrupamento de regenerantes em torno das supostas mães (plantas adultas que os cobrem com a copa) nas Agrupadas do que nas plantas Dispersas, onde os regenerantes aparecem quase como um grupo independente das plantas adultas (Figura 4), o que corrobora a organização verificada no dendrograma (Figura 3).

2.4. Discussão

A população de Pau-rosa em estudo apresenta altos níveis de diversidade genética (% de polimorfismo variando de 78,0 a 85, 1%) o que está coerente com dados para espécies tropicais com polinização cruzada e dispersão de sementes por animais (Hamrick *et al.*, 1992). Em *Cryptocaria moschata* Lauraceae, por exemplo, o polimorfismo foi de 85 %, (alozimas) (Moraes *et al.*, 1998), semelhantes aos nossos dados. Em *Ocotea tenera* Lauraceae, o polimorfismo foi de 44%, a heterozigosidade (Gibson & Wheelwright, 1995). Considerando o processo de exploração que a espécie sofreu, especialmente nesta área, a diversidade estimada é elevada.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) tem-se mostrado eficiente e compatível com a abordagem a que os dados com marcadores RAPD tem sido utilizados, com respeito a distribuição da diversidade genética nas mais variadas condições (Huff *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 1998; Bussel, 1999; Jordano & Godoy, 2000; Escuredo *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2003; Reis & Grattapaglia, 2004). A abordagem que essa análise dá aos dados em Pau-rosa em toda a Reserva Ducke (Tabela 2) mostou que a diversidade genética está essencialmente dentro de cada geração (94,55%) sendo que apenas uma menor fração da diversidade está entre as gerações (5,45%). A alta significância dos testes ($p < 0,0001$) por outro lado, sugere que apesar de ser um valor baixo (5,45%) este não pode ser desconsiderado, isto é, na verdade uma fração da diversidade genética está entre as gerações, o que já foi demonstrado também pela percentagem e número de locos polimórficos, ligeiramente maiores nas regenerantes.

Algumas sugestões podem ser feitas para o aumento de diversidade nesta geração. Inicialmente, pode ter havido uma falha de amostragem, uma vez que se analisou 60 plantas regenerantes e 39 adultas. Por outro lado, quando se arranjou ao acaso as plantas em grupos com mesmo número de amostras, não se observou um padrão estabelecido, isto é, os resultados da porcentagem e número de locos polimórficos variaram a cada combinação sem haver diferença significativa. Esta consideração (amostragem) foi levantada por Seoane *et al.* (2000) trabalhando também com variação genética com isoenzimas entre gerações de populações de Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl., Rutaceae), arbórea tropical da Mata Atlântica. Neste trabalho os autores sugerem que o maior número de alelos detectados nas progênies, em relação aos indivíduos adultos, seria decorrente de problemas amostrais nos adultos, não detectando toda a variação alélica presente na população. Outra explicação para

o maior valor de polimorfismo na geração de regenerantes seria o fato do Pau-rosa ser uma espécie alógama, fazendo com que alelos diferentes oriundos de plantas não coletadas aumentasse os valores de polimorfismo na geração seguinte. Os estudos avaliando diversidade em distintas condições têm mostrado dados variados. Neale (1985) demonstrou, por exemplo, que não houve diferença da diversidade genética em cinco estágios de crescimento para *Pseudotsuga menziensis* var. *menziensis* em área manejada.

A Análise de Variância Molecular confirmou também a falta de relação existente entre o padrão espacial de distribuição das plantas e a diversidade genética. Neste caso, apenas 1,00% ($p < 0,33$) da diversidade pode ser explicado pelo arranjo das plantas na área, embora não tenha sido significativo. Em outras palavras, este arranjo dos grupos não influencia a diversidade da população em análise, mas sim o arranjo das plantas dentro de cada grupo (96,11% ; $p < 0,0001$). Mesmo a diferença entre as gerações dentro de cada grupo tem maior interferência na diversidade do que a distribuição espacial de cada grupo (2,89% ; $p < 0,001$). Outras duas análises suportam as análises da AMOVA quanto ao padrão de diversidade em função da distribuição geográfica. Embora a metodologia aqui utilizada seja apenas uma estimativa e tenha restrições, o fluxo gênico ou número de migrantes por geração entre as dois grupos é muito alto ($Nm = 32,9$). Isto sugere uma troca intensa de alelos entre os grupos dentro da Reserva Ducke, fazendo com que os valores de diversidade sejam homogêneos em toda área. Quando as frequência das 71 bandas avaliadas foram testadas pelo teste exato de Fisher, observou-se também que não houve um desequilíbrio em função da distribuição geográfica ($p > 0,05$).

Observa-se que, ao separar-se os dois grupos para a Análise de Componentes Principais (PCA; Figura 4), há mais plantas regenerantes associadas às adultas nas agrupadas que nas dispersas, o que pode ser explicado pela transferência de regenerantes das agrupadas para as dispersas ou de plantas que não foram amostras neste trabalho.

Há que se considerar, portanto, a importância das aves dispersoras de sementes e a existência de um fluxo gênico intenso ($Nm = 32,9$) entre os dois grupos. Apesar dos RAPDs não serem apropriados para a estimativa de fluxo gênico, sendo, portanto, apenas uma aproximação, outras evidências fortalecem a idéia de alta transferência de alelos entre grupos desta população. Por exemplo, sabe-se que a taxa de dispersão de sementes nas florestas tropicais é alta (Weeb & Peart, 2001) o que não é diferente para Pau-rosa. Dados iniciais de dispersão de sementes em área de plantio de Pau-rosa na Reserva, indicaram que metade dos frutos foi removida das plantas adultas para outras localidades (Spironello *et al.*,

2003), semelhantes a outra espécie de Lauraceae com 46% de remoção de frutos por pássaros (Wheelwright, 1993).

Quando analisado o modelo de distribuição das plantas representado pelo dendrograma e também o teste de Mantel ($r = 0,10$; $p = 0,012$), estes indicam que a diversidade genética entre as plantas adultas pode ser explicada, em pequena parte, pela distância geográfica. Na Figura 3, as plantas com maior similaridade são as representadas pelas letras "A" no dendrograma, exatamente as plantas mais próximas geograficamente (Figura 1). Já as plantas mais dispersas no mapa se encontram mais distantes entre si também no dendrograma.

A falta de similaridade genética entre as plantas adultas e as supostas progênes deve-se à baixa resolução comumente observada neste tipo de análise com marcador dominante como RAPD. Ou seja, é comum não observar este padrão de agrupamento com indivíduos próximos geneticamente (C.Clement, comunicação pessoal, 2004).

2.5. Conclusões

1. Apesar de ser uma ferramenta limitada em alguns aspectos, o RAPD possibilitou detectar altos níveis de diversidade genética na população em Pau-rosa da Reserva Ducke.
2. A diversidade genética de Pau-rosa na Reserva Ducke foi levemente diferente entre as duas gerações avaliadas. Esta afirmação concorda com o maior número e percentagem de locos polimórficos nas plantas regenerantes que nas adultas.

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 a diversidade entre espécies (dentro de um ecossistema) e a variação nos ecossistemas (Frankham, 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, 1996; Young *et al.*, 1996; Geburek, 1997; Primack & Rodrigues, 2002).

Alguns fatores influenciam diretamente os níveis de diversidade em espécies florestais, como as 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). Isto pode ser, em parte, explicado pelas características da biologia reprodutiva, com mecanismos que facilitam 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 como variação genética, a diferenciação ou divergência entre as populações é também uma das características importantes das populações naturais, como consequência das forças evolutivas no processo seleção natural (Steinger *et al.*, 2002).

Portanto, o conhecimento dos níveis de diversidade genética e a compreensão da sua distribuição dentro e entre populações, assim como o conhecimento da divergência genética entre as populações naturais, sobretudo em espécies ameaçadas de extinção, é importante para a 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).

Em função desta necessidade e o do avanço dos marcadores moleculares como RFLP, AFLP, RAPD e microssatélites, muitos trabalhos tem sido realizados com espécies florestais para identificar a estrutura e distribuição da diversidade genética e suas

implicações para estudos de coleções de germoplasma e conservação (Milligan *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 1998; Luikart *et al.*, 1998; Gillies *et al.*, 1999; Lemes *et al.*, 2003; Reis & Grattapaglia, 2004). No caso específico de marcadores RAPD, seu uso pode ser importante quando apropriados cuidados são tomados no que se refere a avaliação de suas bandas e análises de dados considerando suas limitações (Lynch & Milligan, 1994; Yeh *et al.*, 1995; Weising *et al.*, 1995; Gillies *et al.*, 1999).

Padrões de estruturação da diversidade em populações naturais foram detectados com RAPD em espécies importantes como em *Populus tremuloides*, *Isotoma petraea*, *Prunus mahaleb*, além de marcadores RFLP em *Senecio vulgareis* e microssatélites em *Pinus taeda* L. e *Caryocar brasilienses* (Yeh *et al.*, 1995; Bussel, 1999; Pedro & Jordano, 2000; Collevatti *et al.*, 2001; Al-Rabab'ah *et al.*, 2002; Steinger, 2002; Reis & Grattapaglia, 2004). Marcadores RAPD também têm sido amplamente utilizados na avaliação da diversidade genética em muitas espécies ameaçadas de extinção a exemplo de Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*), Aroeira (*Myracrodruon urudeuwa*), Mogno (*Swetenia macrophylla*), *Limonium dufourii*, *Wyethia reticulara* e *Anthericum liliago* (Aires & Ryan, 1997; Palácios & González-Candela, 1997; Cardoso *et al.*, 1998; Gillies *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2003). Seu uso difundido se deve sobretudo a maior simplicidade, custo e rapidez, em comparação com outros marcadores tais como RFLP e microssatélites.

Entre as espécies de importância econômica da Amazônia está o Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae.). 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 (SUDAM, 1972). Hoje suas populações estão ainda mais reduzidas em decorrência da intensa exploração.

Muito embora seja um dos recursos genéticos da Amazônia considerado mais estratégico em função da importância econômica e ameaçada de extinção, 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 verificar a diferenciação genética entre as populações testando a relação existente entre as distâncias genéticas, a distribuição espacial (geográfica) e o fluxo gênico.

3.2. Material e Métodos

Áreas de coleta

Amostras de tecido vegetal foram coletadas nos municípios de Maués (57° 43' 29"O), Parintins (56° 44' 09" O), Silves (58° 12' 33"O) e Manaus (2° 37' S 60° 11' O) na Amazônia Central, Brasil (Figura 1) (IBGE, 1991). Nesta região central, especialmente próximo a Manaus, o gênero *Aniba* possui alta diversidade (número de espécies) (Kubitzki & Renner, 1982). As plantas amostradas em Manaus na área da Reserva Florestal Adolpho Ducke estão a 26 km ao norte de Manaus. As amostras 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, contendo sílica gel (Chase & Hills, 1991) e assim foram transportadas até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, onde foram preservadas em 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. Para as demais foi utilizado o tampão de extração com CTAB (Doyle & Doyle, 1987) que havia sido realizada por Quisen et al. (2003). Esta diferença em protocolos utilizados se deveu ao fato da baixa qualidade do DNA extraído quando do uso do CTAB nas amostras da Reserva Ducke, levando ao uso de outro protocolo, além dos motivos relacionados no Capítulo 1. 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 foram descritos nos Capítulos 1 e 2.

Análises genéticas e estatísticas

As bandas utilizadas nas análises foram as que mostraram reprodutibilidade acima de 80 %. Estimativas da distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações foram feitas através da Análise de Variância Molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) utilizando o programa ARLEQUIM versão 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). A AMOVA também foi utilizada para testar o efeito do Rio Amazonas como barreira geográfica. Neste caso testou-se o quanto da variação ocorria entre dois grupos: grupo da margem direita (Maués e Parintins) e grupo da margem esquerda (Manaus e Silves). Esta mesma comparação foi feita considerando também as populações como sub-grupos dentro de cada grupo. A matriz Euclidiana de distância genética foi utilizada e a significância dos componentes da variação foi testada com 1000 permutações.

Estimou-se o fluxo gênico como média do número de migrantes por geração (Nm) onde $[Nm = 0,5 (1-GST)/(GST)]$ pelas estimativas indiretas de Slatkin & Barton (1989) entre os grupos utilizando o programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). O mesmo programa foi utilizado para calcular o número de locos polimórficos e a percentagem de polimorfismo em cada população.

Para avaliar a grau de diferenciação entre as populações, utilizou-se o teste exato de Fisher (Raymond & Rousset, 1995) e programa TFGA (Miller, 1997) onde se verificou a existência de diferenças significativas entre as freqüências dos marcadores (bandas).

As distâncias geográficas entre os pontos foram obtidas indiretamente 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 distâncias geográficas e as matrizes de distâncias genéticas e de fluxos gênicos, assim como entre fluxos gênicos e distâncias genéticas para avaliar a correlação entre estas variáveis. Estes testes foram feitos no programa TFGA na rotina teste de Mantel (1967) utilizando-se 1000 permutações.

Calculou-se a distância ou divergência genética entre as populações pelo programa TFPGA, onde se utilizou a distância de Nei (1978) com o algoritmo UPGMA (média aritmética não ponderada). Para que estas estimativas fossem possíveis, considerando as limitações do marcador RAPD para estimá-los, optou-se pelas correções sugeridas por Lynch & Milligan (1994) para marcadores dominantes disponível no programa TFPGA.

Fez-se ainda o cálculo dos índices de similaridade genética de Jaccard entre os indivíduos e utilizando o método de agrupamento UPGMA e análise de Componentes Principais (PCA). Ambos os procedimentos foram feitos utilizando o programa NTSYS – pc versão 1.60 (Rohlf, 1990).

Para observar o efeito do tamanho das amostras sobre a diversidade, fez-se uma amostragem aleatória de plantas e de número de marcadores simultaneamente, em ordem crescente, e calculou-se o valor da diversidade de Nei (1973) cumulativa (o índice foi calculado no POPGENE). Os dados foram plotados no programa SYSTAT 9.0, onde calculou-se o valor da correlação de Pearson com as respectivas probabilidades.

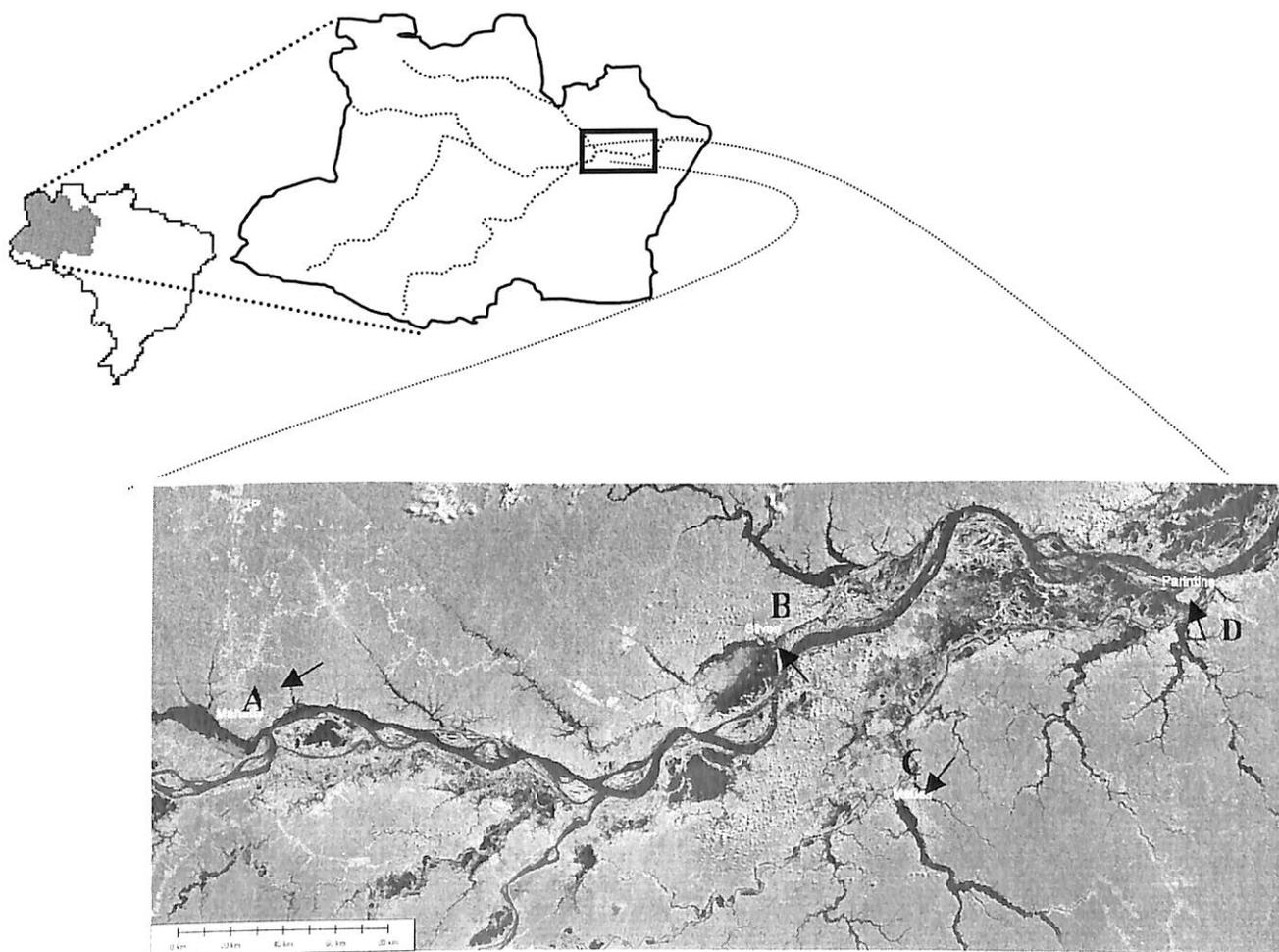


Figura 1. Localização das populações amostradas de Pau-rosa. A-Reserva Ducke (Manaus); B-Silves; C-Maués e D- Parintins. Fonte: GISLAB – INPA (Landsat TM).

3.3. Resultados

Embora no Capítulo 2 tenham sido utilizados nove “primers”, seu uso nesta fase do trabalho foi inviabilizada pela falta de *Taq* polimerase para aumentar este número. Apesar disto, o número de bandas obtidas foi suficiente para os objetivos propostos. Os quatro “primers” geraram 51 fragmentos no total, sendo que apenas 35 fragmentos foram utilizados, uma vez que apenas estas apresentaram padrões de reprodutibilidade acima de 80% (Capítulo 1). Destas 32 (91,42 %) mostraram-se polimórficos. O tamanho dos fragmentos variou para cada “primer” de 510 a 1900 pb (P4); de 470 a 1570 pb (P16); de 490 a 1500 pb (P22) e de 450 a 2000 pb (P48). Para o “primer” 22 gerou-se 8 bandas, sendo 6 polimórficas. O número de locos polimórficos variou entre as populações. Manaus apresentou o maior valor (83,0%), Silves 76,5%, Maués 79,2% e Parintins 75,0% de polimorfismos.

Tabela 1. AMOVA de dados RAPD para Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) onde avaliou-se a distribuição da diversidade entre e dentro das quatro populações. Testou-se ainda a distribuição da diversidade dentro de dois grupos (margens esquerda – Manaus e Silves) e margem direita – Maués e Parintins) do Rio Amazonas.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	% variação	P*
Entre pop.	3	176,012	1,94696	24,41	<0,0001
Dentro das pop.	105	668,923	6,37070	76,59	<0,0001
Total	108	844,936	8,31766	-	-
Entre grupos	1	69,616	0,27555	3,28	<0,0001
Entre pop. dentro grupos	2	106,397	1,76326	20,97	<0,0001
Dentro das populações	105	668,123	6,6463	75,76	<0,0001
Total	108	844,936	8,40951	-	-

* significância dos testes

Pela Análise de Variância Molecular (AMOVA), a diversidade genética dentro das quatro populações foi de 76,59% e entre estas de 24,41% ($p = 0,001$; Tabela 1). Já os dois grupos analisados (margens direita e esquerda do Rio Amazonas) mostraram que contribuem com 3,28% ($p < 0,0001$) da diversidade, sendo que o restante (20,97%; $p < 0,0001$) foi atribuído à diferença entre as populações dentro de cada grupo e a maior parte à diversidade dentro das populações (75,76%; $p < 0,0001$). Por outro lado, ao se fazer a AMOVA entre cada grupo, desconsiderando um terceiro nível hierárquico (no caso a

existência de duas população diferentes em cada margem), a variação atribuída à separação pelo Rio Amazonas aumentou (13,81%) com alta significância ($p < 0,0001$).

O teste de Fisher mostrou diferenças entre as frequências das bandas das populações ($p < 0,05$ para todos os pares de comparação). 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) (Figura 2).

As populações do Baixo Amazonas (Silves, Maués e Parintins) divergiram da população de Manaus pela distância de Nei (1978) (Figura 3), sendo estas três mais similares geneticamente. No dendrograma, as populações de Maués e Parintins são as populações mais próximas entre si e Silves é a mais próxima de Manaus.

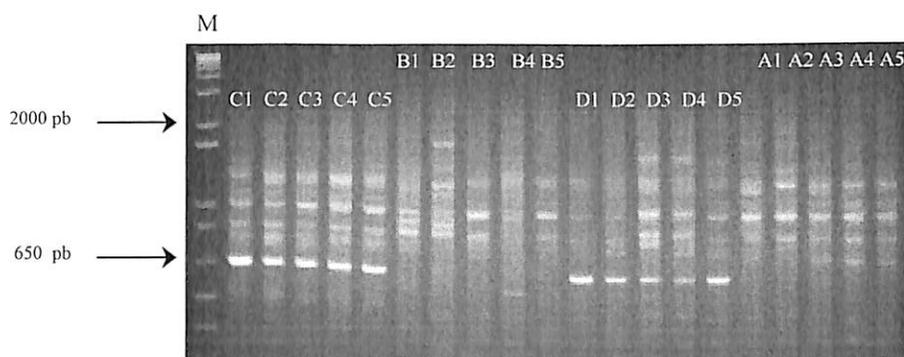


Figura 2. Padrão eletroforético de bandas RAPD-PCR do “primer” P22 em amostras de quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): A-Ducke; B- Maués; C-Silves e D-Parintins e. M= marcador 1 Kb Ladder. O fragmento com tamanho médio de 650 pb aparece apenas nas populações C e D.

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 ($r = 0,74$; $p = 0,19$); entre distâncias geográficas (DG) e índices de fluxo gênico (Nm) foi $r = (-0,78$; $p = 0,12$); e distâncias genéticas (Dgen) e fluxo gênico (Nm) valor alto e negativo $r = (-0,95$; $p = 0,06$).

Tabela 2. Matriz de distâncias geográficas em km (DG) e fluxos gênicos (Nm) (número de migrantes por geração) para quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).

	Reserva Manaus (A)		Silves (B)		Maués (C)	
	DG	Nm	DG	Nm	DG	Nm
Silves (B)	200	2,50	-	-		
Maués (C)	264	2,66	87	3,30	-	-
Parintins(D)	370	2,42	170	3,91	135	4,40

A Análise de Componentes Principais (Figura 4) corrobora os dados anteriores. Há uma clara separação entre as populações, exceto entre as populações de Maués e Parintins. Observou-se também a maior dispersão das plantas de Manaus e maior coesão na população de Silves (B).

Quando se agrupou as plantas pelo método UPGMA (Figura 4), utilizando o índice de similaridade de Jaccard, observou-se formação clara dos grupos distintos, onde a maior parte dos indivíduos agrupou-se dentro de suas respectivas populações. A similaridade entre as amostras foi de aproximadamente 50% até 96%. A exemplo da Figura 3, as populações de Maués e Parintins (C e D), partindo de um mesmo ramo, geraram grupos intercalados (similaridade aproximada de 68%). Os indivíduos de Silves (B) apresentaram agrupamento mais coeso do que os demais. A população de Manaus (A) apresentou-se organizada em dois grupos.

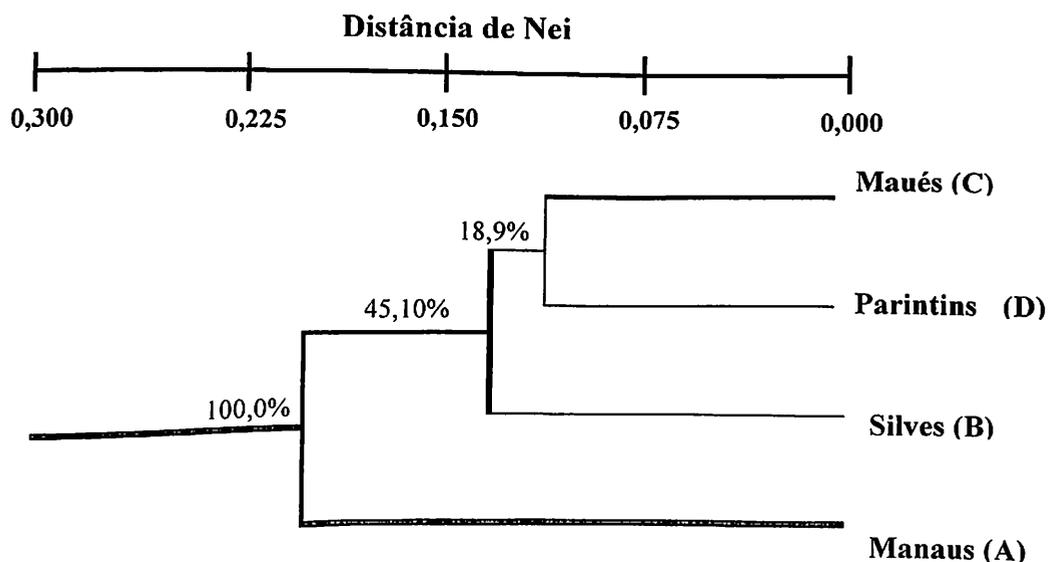


Figura 3. Agrupamento de quatro populações de Pau-rosa utilizando as distâncias de Nei (1978) e o critério UPGMA. Em cada ramo, o valor da porcentagem de locos que dá suporte a análise Com base na análise de locos RAPD.

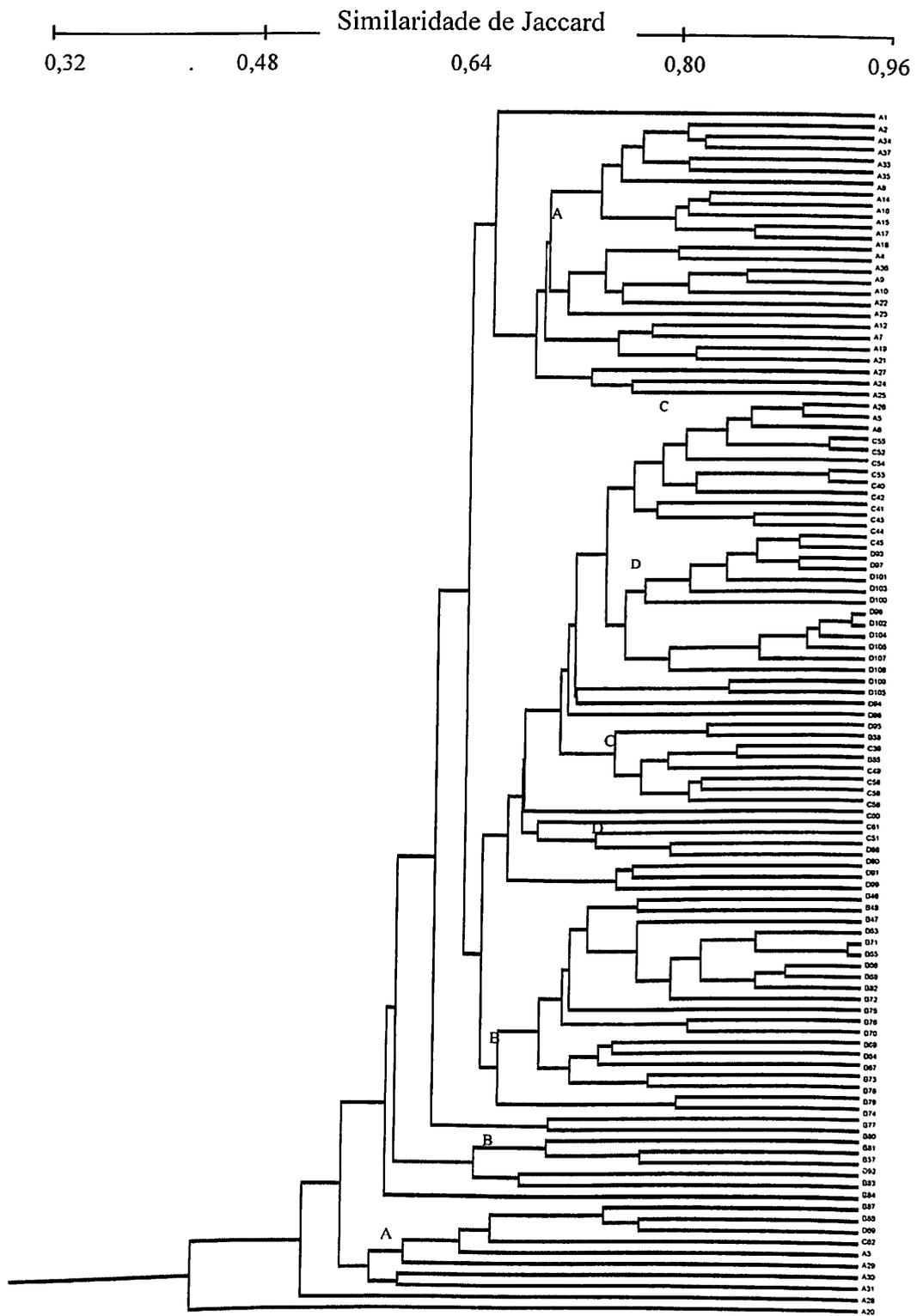


Figura 4. Agrupamento de todos os indivíduos de quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). A-Reserva Ducke (Manaus); B- Silves;C- Maués e D - Parintins. O índice de similaridade utilizado foi o de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.

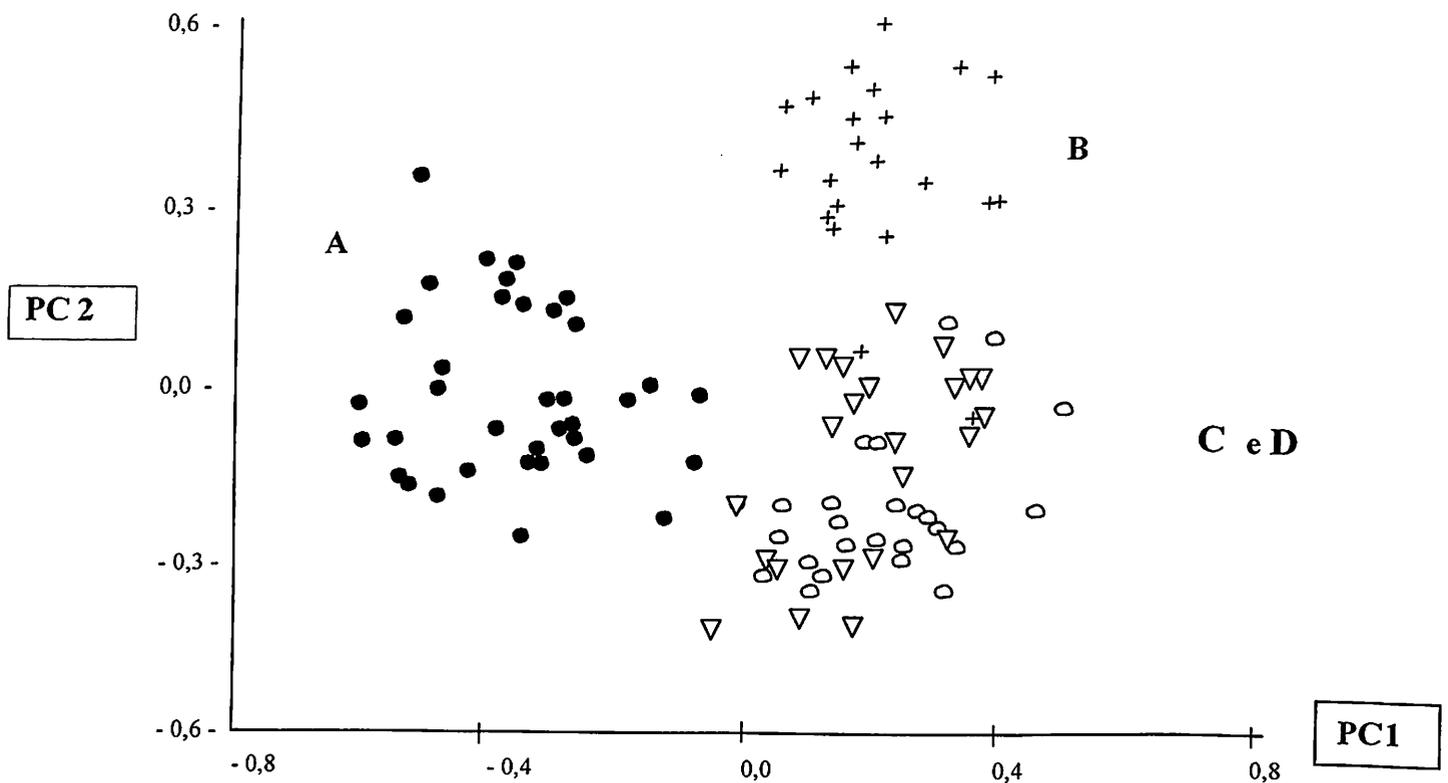


Figura 5. Representação bidimensional da Análise de Componentes Principais entre quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) calculados em marcadores moleculares RAPD – PCR. Populações: A-Manaus (●); B-Silves (†); C-Maués (▽) e D-Parintins (○). O eixo PC1 explica 25,58% da diversidade e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

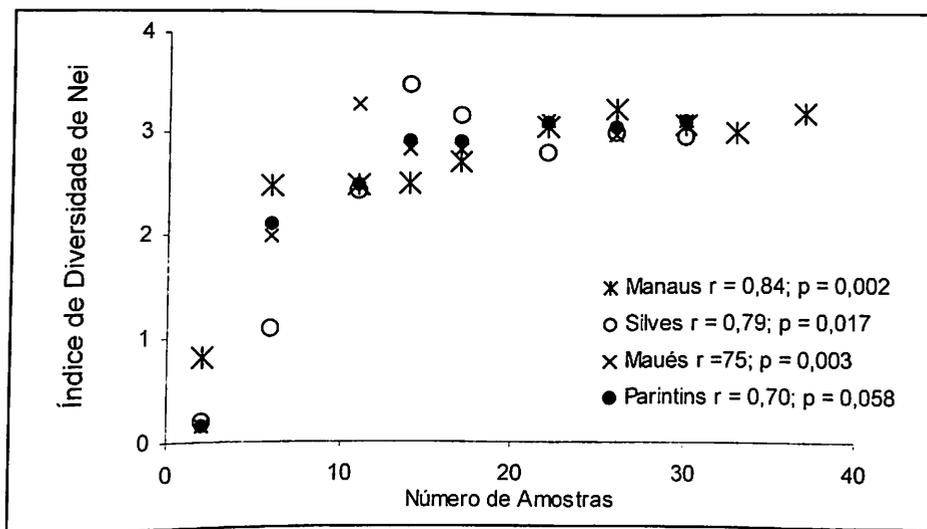


Figura 6. Diversidade genética acumulada de Nei (1973) em função do número de amostras em quatro populações de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). O valor de diversidade de Nei equivale a 10 vezes o seu valor real.

3.4. Discussão

Os 35 fragmentos RAPD geraram para o Pau-rosa altos níveis de polimorfismo variando de 75% a 83%, estando coerentes com a tendência geral de espécies tropicais alógamas (Hamrick *et al.*, 1992), já que quanto maior os níveis de cruzamento maior os níveis de variabilidade (Bawa *et al.*, 1990). Por exemplo, quando a dispersão é endozoocórica (sementes ingeridas por animais) e quando a polinização é pelo vento, os valores respectivos de locos polimórficos são de 59,5% e 67,8%, dados revisados para isoenzimas (Hamirick *et al.*, 1992). Análises de populações naturais, a exemplo de *Cryptocaria moschata* (Lauraceae arbórea da Mata Atlântica), indicaram um polimorfismo de 85,0% (isoenzimas) (Moraes *et al.*, 1998). *Myrciaria floribunda* (também Lauraceae arbórea de sub-bosque da Mata Atlântica) apresentou polimorfismo estimado com marcadores isoenzimáticos de 85,7% entre populações (Vasconcelos, 2002). Estes valores são próximos aos obtidos para Pau-rosa. Na América Central, populações de *Ocotea tenera* avaliadas também com isoenzimas, apresentaram percentagem de polimorfismo de 44% (Gibson & Wheelwright, 1995). A alta diversidade pode ser associada às características ecológicas comumente encontradas nas Lauraceae como dioicia, 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). Portanto, o alto polimorfismo em Pau-rosa e a alta diferenciação entre as populações demonstrados pela AMOVA podem explicar a alta variação de diversidade genética nesta espécie.

A princípio, o que se espera é que a diversidade genética seja menor em espécies ameaçadas de extinção ou que sofreram historicamente processos predatórios intensos (Lacy, 1987; Buza *et al.*, 2000; Matocq & Villablanca, 2001). Por outro lado, recentes estudos utilizando ferramentas moleculares em espécies tropicais que sofrem ainda com intensa exploração têm apresentado valores de alta diversidade, a exemplo de *Dinizia excelsa* (Fabaceae) e Mogno (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) (Dick, 2001; Lemes *et al.*, 2003). O que se tem discutido é que a seleção dos indivíduos com maior diâmetro à altura do peito e altura promove a remoção apenas de uma parte da diversidade, sendo que a maior parte permanece nos estágios mais jovens, como ficou demonstrado no Capítulo 2 deste trabalho. Uma das implicações destas características é que a busca de diversidade para futuros programas de conservação ou para programas de melhoramento, por meio de

populações que entre, em Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*) a diversidade chegou a 42% (Cardoso *et al.*, 1998), além de 97% também para outra espécie tropical arbórea (*Ingá thibaudiana*; Schierenbeck *et al.*, 1997) e de 80% dentro das populações de Mogno (*Switenia macrophylla*; Gillies *et al.*, 1999).

Nesse raciocínio, a AMOVA também mostrou, com alta significância, o quanto as populações estão diferenciadas, já que a diversidade entre as populações esta na ordem de 23,41% ($p < 0,0001$). Se a distância geográfica entre as populações pode imprimir uma diferenciação mais pronunciada entre as populações, talvez a divisão das populações em grupos pelo Rio Amazonas também o faça. A AMOVA mostrou que apenas uma pequena fração da diversidade pode ser explicada pela barreira do rio, quando a distância entre as populações dentro dos grupos também é considerada (3,28%; $p < 0,0001$). Já dentro de cada grupo (margem do rio) a diferença foi bem maior (20,97%) indicando que a distância entre as populações dentro de cada grupo pode interferir mais no fluxo gênico que a barreira do rio. (Tabela 1). Por outro lado, se desconsiderado o efeito da diferença das populações dentro de cada grupo, isto é, tomando-se a análise apenas entre dois grupos (cada lado do rio), o valor da diversidade aumenta (13,81; $p < 0,0001$), indicando que a distância entre as populações de cada lado tem peso nesta consideração e dilui o efeito que o rio teria na diversidade. Observa-se, portanto, um efeito significativo do Rio Amazonas na transferência de pólen e/ou sementes entre os grupos. Esta abordagem foi realizada para avaliação da diversidade em Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) uma Anacardeaceae do cerrado ameaçada de extinção. A AMOVA realizada com RAPD mostrou uma maior diversidade dentro dos grupos do mesmo lado do Rio São Francisco do que entre os grupos (3,54%; $p = 0,0097$; Reis & Grattapaglia, 2004). Neste caso, os autores concluíram que o Rio São Francisco não limitou o fluxo gênico entre os grupos de cada lado. O valor obtido para os dois grupos de Pau-rosa para cada lado do rio, entretanto, é significativamente maior que neste da Aroeira.

Como já mencionado, os resultados da AMOVA - 23,41% da diversidade - podem sugerir uma alta e significativa diferença entre as populações ($p < 0,0001$). Esta sugestão é suportada também pelo teste exato de Fisher. As mudanças significativas nas frequências dos marcadores, apontadas por esta análise, também combinam com as estimativas de fluxo gênico entre as populações ($Nm = 2,02$), uma vez que quando este é baixo, as diferenças detectadas implicam no surgimento de características típicas dentro das populações. É válido salientar que os valores de fluxo gênico aqui apresentados são aproximações dos valores reais, já que se tratam de estimativas e sobretudo pelo fato do marcador RAPD, de

natureza dominante, não sendo apropriado para se fazer os teste de Fst, que é o princípio teórico para o cálculo de Nm.

Mesmo com estas limitações do marcador para esta estimativa de Nm, os mais baixos índices de diversidade e de fluxo gênico podem explicar a possível troca de genes ao longo das gerações, ocorrendo entre plantas da população de Silves (Tabela 2). Se por um lado as barreiras físicas limitam mais o fluxo gênico entre Silves e Maués, as distâncias geográficas influenciam o baixo fluxo gênico entre Silves e Parintins e também entre Silves e Manaus. Estas sugestões podem ser verificadas pelos valores da AMOVA (20,97 % de diferenciação entre populações do mesmo lado do rio). Embora baixo, o valor 3,28% ($p < 0,0001$) é altamente significativo, sugerindo que o Rio Amazonas também influencia na troca de genes entre as populações de cada margem. 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, a população de Silves apresenta-se relativamente isolada, em relação à Maués e Parintins (Rio Amazonas) e também a Manaus (distância geográfica) o que fez com que houvesse uma maior troca de genes entre seus indivíduos com maior distanciamento genético, mostrado também na Figura 4.

A divergência ou diferenciação genética entre populações naturais está associada ao isolamento destas, 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, somente a distância geográfica não explica os resultados obtidos para as populações de Silves e Maués. Quando se testou esta associação entre os pares de populações com teste de Mantel (1967), de fato, o grau de correlação entre as distâncias geográficas e os valores de fluxo gênico explicaram apenas em parte esta tendência para as populações de Pau-rosa. Isto indica uma influência decisiva das distâncias entre as populações, mas não absoluta sobre a interação entre elas ($r = -0,74$; $p = 0,19$). No entanto, a correlação entre o fluxo gênico e distância genética foi quase absoluta ($r = -0,95$; $p = 0,06$) indicando a maior influência do fluxo gênico sobre as distâncias genéticas entre as populações.

Claramente se observa que a população de Manaus divergiu das demais (Figuras 3, 4 e 5 e AMOVA) o que certamente foi influenciado pela distância geográfica e determinado pelo mais baixo fluxo gênico. Não se pode deixar de considerar a possibilidade de que as populações amostradas possam fazer 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". Isso poderia explicar 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 este modelo.

Desta forma, para trabalhos posteriores, seria interessante o levantamento e análise das populações que se encontram nestas áreas intermediárias ainda não amostradas, para entender melhor o gradiente de diversidade e a correlação entre as distâncias geográficas e genéticas.

3.5. Conclusões

- 1- As populações mostraram-se com níveis consideráveis de diversidade e diferenciação, o que pôde ser explicado pela interação entre índices de fluxo gênico, de distâncias geográficas e pela existência da barreira física entre populações representada pelo Rio Amazonas.

- 2- Embora não seja possível acessar a diversidade inicial das populações, os altos valores de diversidade mostram que mesmo sob intensa exploração o Pau-rosa mantém sua variabilidade, o que pode ser explicado, em parte, pela manutenção desta diversidade em classes de idade mais jovens.

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 espécies arbóreas tropicais, a definição das taxas de cruzamento, 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 merece maior atenção. Infelizmente, não se pode fazer comparações entre os dados obtidos neste estudo e dados oriundos de uma população que não foi explorada já que, atualmente, é extremamente difícil encontrar populações de Pau-rosa intocadas. Isto seria o ideal para ter uma melhor e mais direta noção dos impactos da exploração na diversidade genética. Outra limitação importante é a da ferramenta utilizada, o RAPD. Apesar da utilização das bandas com reprodutibilidade maior que 80% e das significâncias estatísticas dos testes, muitos dados são estimados e alguns parâmetros devem ser visto com cautela (como os valores de fluxo gênico e distância genética).

Ainda assim, algumas considerações podem ser formuladas a partir dos resultados aqui gerados. Para a população da Reserva Florestal Adolpho Ducke, ainda que baixo o valor da diversidade entre as gerações, este foi altamente significativo. Observou-se uma flutuação na diversidade genética entre as duas gerações. Por outro lado, o padrão geográfico nos dois distintos grupos não influenciou na distribuição da diversidade genética na área. Estes dados implicam no fato de que a diversidade estimada numa área ampla como a Reserva encontra-se estruturada essencialmente dentro dos grupamentos e maior nas plantas regenerantes. A maior diversidade na geração de regenerante pode ser um indicativo de que a manutenção da variabilidade pode ser mantida no caso de coleta de material para produção de mudas. Todos os índices apontam para altos valores de diversidade quando comparados com índices apresentados para outras espécies. Os índices de diversidade estimados para as populações de Manaus, Maués, Silves e Parintins, a de Manaus apresentou os maiores índices de diversidade (Capítulo 3). Tomando em conjunto os resultados, foi detectada uma diferenciação entre as populações, provavelmente em função das distancias geográficas a que as populações estão. 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, como aparentemente aconteceu nas outras populações.

As características reprodutivas (dioícia e protoginia) e de dispersão do pólen (relacionada a pequenos insetos) e de sementes (associada à atividade dos pássaros, principalmente tucanos) são 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 atual distribuição da variabilidade 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 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 os objetivos deste trabalho – seja com outros, como microssatélites. Desta forma outros dados seriam somados e algumas das perguntas e hipóteses que permanecem ao fim 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.; Olício, R.; Seuánez, H.N. 2001. Técnicas de avaliação da diversidade genética. In: Garay, I. & Dias, B. (Eds.) *Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais*. Petrópolis: Editora Vozes. p.268-294.
- Al-Rabab'ah, M.A.; Williams, C.G. 2002. Population dynamics of *Pinus taeda* L. based on nuclear microsatellites *Forest Ecology and Management* 163: 263–271.
- 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 Amazonica*, 30(3): 377–392.
- 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: 45–47.
- Ashworth, V.E.T.M.; Kobayashi, M.C.; De La Cruz, M.; Clegg, M.T. 2004. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae* (in press).
- Ayres, D.R.; Ryan, F.J. 1997. The clonal and population structure of a rare endemic plant, *Wyethia reticulata* (Asteraceae): allozyme and RAPD analysis. *Molecular Ecology* 6: 761-772.
- 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*. Roma: Unesco – Man and Biosphere Series V 7. p.3-12.
- 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: 202–206.
- 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: 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.; Ferreiras, 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.

- Changtroun, 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.
- Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. 2001. High resolution microsatellite based of mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86: 60–67.
- 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: Editora da UFV. 442 pp.
- Dick, C.W. 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proc. R. Soc. Lond. B* 26: 2391–2396.
- Dick, C.W. Etchelecu, G.A. Austerlitz, F. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology* 12: 753–764.

- 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: p.1349.
- Ellstrand, N.C. 1992. Gene flow among seed plant populations. *New Forests* 6: 241 – 256.
- Epperson, B.K. 1992. Spacial structure of genetic variation within populations of forest tree. *New Forest, 6: 257–278.*
- Escuredo, A.; Iriundo, 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. Unesp. *Revista Holos* (Edição especial) 33–59.
- Ferreira, M.E. 2001. Técnicas e estratégias para caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: Garay, I. & Dias, B.(Eds.) *Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais*. Petrópolis: Editora vozes. p.233-267.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Embrapa – Cenargen, 3ª Ed. 220pp.
- 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. 631pp.

- 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*. Petrópolis: Editora Vozes. p.112-127.
- 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. *Heredit.*, 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. In: Grainer, A.(Ed.) *Controlling tropical deforestation*. London: Earthscan Publications Ltda. p.146–173.
- Grattapaglia, D. 1997. Pseudo – testcross mapping strategy using RAPD markers. In: Micheli, M.R & Bova, R. (Eds.) *Fingerprinting methods based on arbitrarily primer PCR*. Berlin: Springer Verlag. p.201–217.
- Gregorius, H.R. 1987. The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theor. Appl. Genet.* 74: 397–401.
- Groom, M.J. 2001. Consequences of subpopulation isolation for pollination, herbivory and population growth in *Clarkia concinna concinna* (Onagraceae). *Biological Conservation* 100, 55–63.
- Haig, S. M. 1998. Molecular contributions for conservation. *Evolution* 79, :413–425.

- 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): 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*. 3rd Sunderland, MA: Ed. Sinauer Associates.
- Heywood, V.H.; Iriondo, J.M. 2003. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113: 321–335.
- Huff, D.R.; Peakall, R.; Smouse, P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides* (Nurr.) Engelm.). *Theor. Appl Genet* 86: 927–934.
- IBAMA. 1992. 1^a Portaria Nº 37 de 3 de abril de 1992.
- IBGE. 1991. *Geografia do Brasil – Região Norte*. Vol. 3. Rio de Janeiro: 308pp.
- 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: 1–10.
- 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: 381–390.
- 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* 43:1117-1119.
- Kodak Digital Science. 1 D Image Analysis Software, Version 3.0. 1999. *Windows User's Manual*. Eastman Kodak Company. Rochester, NY. USA
- Kubitzki, K.; Kurz, H. 1984. Sincronized dichogamy and dioecy in Neotropical Lauraceae. *Plant Systematics and Evolution*, v. 147: 253–266.
- Kubitzki, K.; Renner, S. 1982. Lauraceae I (*Aniba* and *Aiouea*). *Flora Neotropica*, Monograph number 31. The New York Botanical Garden. 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: 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; 87–108.

- 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: 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. . Documento 6. Manaus: *Embrapa Amazônia Ocidental*. 43pp.
- 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: 2875–2883.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381–398.
- Li, Y.C.; Karol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology* 11: 2453–2465.
- Li, Y.C.; Karol, A.B.; Fahima, T.; Nevo, E. 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* vol 21, n 6: 992–1007.
- Lindenmayer, D.B.; Margules, C.R.; Botkin, D.B. 2000. Indicators of biodiversity for ecologically sustainable forest management. *Conservation Biology* 14: 941–950.
- Litt, M.; Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 398–401.
- Loveless, M.D.; & Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Annual Review of Ecology and Systematics*. v.15: 65–95.
- Loveless, M.D.; Hamrick, J.L. 1987. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. *Rev. Biol. Trop.*, 35 (Supl. 1): 165–175.

- Milach, S. C.K. Marcadores moleculares – aplicação no melhoramento de plantas. *Revista Biotecnologia*. Disponível em: [www. Biotecnologia.com.br](http://www.Biotecnologia.com.br). Acessado em: 06 de agosto de 2002.
- 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.
- Mitchell, T.; Rivera, E. 1998. Geographic patterns of genetic diversity in *Pousenia armata* (Moraceae): implications for the theory of Pleistocene refugia and the importance of riparian forest. *Journal of Biogeography* 25: 695–705.
- 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. São Paulo: Editora UNESP. 234 pp.
- Mittermeier, R.A.; Ayres, J.M.; Werner, T.; Fonseca, G.A.B. 1992. O país da Megadiversidade. *Ciência Hoje* 14: 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* 22. v. 2: 237–248.
- Mullis, K.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55: 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): 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: 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: 995–1005.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 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: 1643-1644.
- Nkongolo, K.K.; Klimaszewska, 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): 543–567.

- Olsen, K.M.; Schaal, B.A. 2001. Microsatellite variation in Cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88(1): 131–142.
- Palacios, C.; Gonzalez-Candelas. 1997. Analyses of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourei* (Plumbagiaceae). *Molecular Ecology* 6: 1107–1121.
- 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): 361–382.
- Péres, T.; Albornoz, J. & Domínguez, A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology* 7: 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: 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: 253–258.
- Primack, B.; Rodrigues, E. 2002. *Biologia da Conservação*. 3ª Ed. Londrina: Editora Vida 328pp.
- 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: 7–20.
- Putz, E.F.; Dykstra, D.P.; Heinrich, R. 2000. Why poor logging practices persist in the tropics. *Conservation Biology* 14: 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.p 87.
- Raymond, M.; F. Rousset, 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Reed, D. H.; Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230–237.
- Reis, A.M.M.; Grattapaglia, D. 2004. RAPD variation in a germoplasm collection of *Myracrodrum urundeuva* (Anacardeaceae), and endangered tropical tree: Recommendations for conservation. *Genetic Resource and Crop Evolution* 51: 529-538.
- 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*. Manaus: INPA - DFIP.816 pp.
- 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*. Sunderland, MA: Sinauer. p.181–189.
- 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*. Manaus: INPA. 269pp.
- 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*. Manaus: Sebrae/INPA. 409pp.
- Santana, J.A.S. 2000. Distribuição espacial da regeneração natural de *Aniba rosaeodora* (Pau – rosa). *Rev. Ciênc. Agrár.* n. 33: 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. 352pp.
- 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.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, I. 2000. Arlequin ver. 2.000: *A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- 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.

- 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.; Marengo, 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.
- Steinger, T.; Haldimann, P; Leiss, K.A; Müller-Scharer, H. 2002. Does natural selection promote population divergence? A comparative analysis of population structure using amplified fragment length polymorphism markers and quantitative traits. *Molecular Ecology* 3: 2583-2590.
- Storfer, A. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation* 87: 173–180.
- SUDAM. 1972. O extrativismo do Pau-rosa (*Aniba Duckei*, Kostem – *A. rosaeodora*, Duckei): Aspectos sócio – econômicos a silvicultura da espécie. *SUDAM*. Belém: *doc.amaz.* 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, 84pp.
- 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. São Paulo: Editora UNESP. 234pp.

- 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. 445 pp.
- 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: 163-174.
- Whitmore, T.C. 1998. *An introduction a tropical rain forest*. 2 Ed. Oxford University Press. New York –USA. 282pp.
- 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*. Washington, D.C.: National Acadêmic Press. 521pp.
- Yahoo notícias. 2003. Disponível em: 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, 430–436.

- Yeh, F. C.; Chong, K.D.X.; Yang, R.C. 1995. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *Journal of Heredity* 86: 445–460.
- Yeh, F. C.; Yang, R.C.; Boyle, T. 1999. POPGENE: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis: version 1.3: manual. Edmonton: University of Alberta. 29pp.
- 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: p 2606.
- Zenga, L., Kwon, T.R.; Liu, X.; Wilson, C.2004. Genetic diversity analyzed by microsatellite markers among rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different adaptations to saline soils . *Plant Science* 166:1275–1285.
- Zhang, D.X.; Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563–584.