

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS
DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervum* C.DC.)
VISANDO SEU USO E CONSERVAÇÃO**

LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA WADT
Engenheira Florestal

Orientador: Prof. Dr. **PAULO YOSHIO KAGEYAMA**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro – 2001

Aos meus queridos

Natália Wadt

Patrícia Wadt

Lucas Wadt e

Paulo G. S. Wadt

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida e por todas as coisas que me aconteceram durante esse período de lutas e vitórias, pois tenho certeza que cresci e amadureci muito.

Durante esses quatro anos de doutorado foram muitas as pessoas que conheci e que me apoiaram. Algumas delas são muito especiais, sendo consideradas como minha família em Piracicaba; não é necessário citar nomes, pois cada um deles sabe muito bem o carinho que sinto. Fui muito bem tratada e até mesmo paparicada por pessoas que se desdobraram para fazer algo por.

Creio não ser capaz de escrever esses agradecimentos como o meu coração deseja, no entanto, vou tentar lembrar de todos aqueles que participaram e dividiram comigo as ansiedades, o trabalho, a conquista de ver cada etapa concluída e até mesmo aqueles que de longe estiveram torcendo por mim.

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, que como orientador me proporcionou o privilégio de estar defendendo esta tese de doutorado, pois acreditou no meu trabalho e sempre me apoiou;

Aos doutores Roland Vencovsky, Acelino C. Alfenas, Ana Ciampi, Edson Mori, Maurício Reis e Luís Eduardo Aranha, por aceitarem participar da banca examinadora;

Ao colega Alexandre Coelho, pela ajuda nas análises estatísticas e pela paciência em me atender nas infinitas vezes que o procurei;

Ao colega Flávio B. Gandara, pela ajuda em todas as etapas do trabalho, principalmente pelas discussões que foram fundamentais para clarear muitas dúvidas;

Ao Prof. Dr. Raymond Pacovsky, pela amizade e orientações nos trabalhos de laboratório;

À Dra. Marília Franco Caixeta, pela amizade e apoio;

Ao Prof. Luiz Antônio Gallo, por ceder um espaço em seu laboratório para realização de uma das etapas deste trabalho;

Ao amigo Evandro Almeida Tupinambá (Embrapa Tabuleiros Costeiros), pelo apoio e preciosa amizade;

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP, incluindo os professores e funcionários, pela oportunidade de realização deste trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos;

Ao Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), do Departamento de Ciências Florestais – ESALQ/USP, pelo apoio dado, proporcionando todas as condições para a realização deste trabalho;

À Embrapa Acre, especialmente aos doutores Judson Valentin e Ivandir Soares Campos, que como chefes acreditaram e apoiaram a realização deste trabalho;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

Ao DFID, pelo apoio financeiro;

Aos meus pais José Carlos e Vilma Lúcia, pela paciência em suportar minha ausência e por cuidarem dos meus filhos e marido durante esses quatro anos. Sem a ajuda deles seria muito mais difícil concluir esse trabalho;

Ao meu querido esposo Paulo Guilherme, pelo apoio e compreensão; aos meus filhos Natália, Patrícia e Lucas que nem imaginam o quanto me ajudaram, pela compreensão que eles tiveram das muitas vezes que me ausentei;

Aos colegas de laboratório, Beatriz, Helena, Luciano, Median, Milene, Alexandre Sebbenn, João, Cristina Lacerda, agradeço a amizade e a imensa ajuda que todos me deram para a realização deste trabalho, destacando as discussões científicas, esclarecimento de dúvidas, manipulação de programas estatísticos e análise de dados, entre tantas outras coisas;

Aos preciosos amigos e “filhinhos”, Gabriel, Clarissa, Andreia, Alberto (Beto) e Ester, que me ajudaram muito nas análises de laboratório e sem eles esse trabalho não estaria sendo concluído nesse momento;

À Elza M. Ferraz e Gelson D. Fernandes, pelo apoio e carinho durante esses quatro anos, em que tiveram a maior paciência comigo, agüentando todas minhas choradeiras e reclamações no laboratório;

Aos colegas de curso, dos quais quero destacar: a Aldete e a Bia, por terem dividido comigo suas casas; a Fernanda Gaiotto pela amizade e incentivo; e a Martha Smith e sua família pela amizade e carinho;

Aos colegas de trabalho, Marcelo, Francisco Ledo, João Alencar, Flávio Pimentel, Evandro, Maju, Nádia, John Lenon, Elisângela, Thiago, Rubens, Hailton M. Araújo, José de Goes Ferreira e tantos outros que me ajudaram e apoiaram em várias etapas deste trabalho;

Ao meu grande amigo João Matos, que não tenho palavras para agradecer tudo o que tem feito por mim, pela sua atenção e carinho. À Silvia Matos pela amizade e carinho, me acolhendo em sua casa e aos pequeninos Jonas e João Pedro pelos filmes que assisti com eles e pelos momentos de descontração que me proporcionaram;

Aos preciosos amigos Eder Ferraz, Elza, Matheus, Nathalia e Pancinha, que foram como a minha família, dividindo casa, carro, almoços e jantares, além de estarem presentes nas fases mais difíceis deste trabalho;

À minha “mãezinha” Maria Amélia, que sempre esteve presente e me apoiando em todas as fases deste trabalho, que se preocupava comigo e fazia de tudo para me ajudar. Ao Sr. Inácio, por dividir sua esposa, Maria Amélia, comigo, deixando que eu abusasse de seu tempo e carinho;

Aos amigos Luciano, Viviane, Juliana e Rebeca, pela amizade e carinho dispensados, que embora eles nem imaginam, me ajudaram muito durante essa caminhada;

Ao meu irmão Caique e cunhada Carolina, que entenderam minha ausência e tanta dedicação a esse trabalho, torcendo por mim todo o tempo;

Agradeço a todos que de uma maneira ou de outra me ajudaram a vencer mais essa etapa da minha vida.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE FIGURAS _____ | vii |
| LISTA DE TABELAS _____ | ix |
| RESUMO _____ | x |
| SUMMARY _____ | xii |
| 1. INTRODUÇÃO _____ | 1 |
| 2. OBJETIVOS _____ | 4 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA _____ | 5 |
| 3.1 - Considerações gerais _____ | 5 |
| 3.2 - Referencial histórico _____ | 7 |
| 3.3 - Espécies de pimenta longa e ocorrência geográfica no estado do Acre _____ | 8 |
| 3.4 - Descrição botânica de <i>Piper hispidinervum</i> _____ | 10 |
| 3.5 - Características ecológicas de <i>Piper hispidinervum</i> _____ | 10 |
| 3.6 - Estrutura genética de populações _____ | 12 |
| 3.7 - Marcadores moleculares _____ | 20 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS _____ | 22 |
| 4.1 - Extração de DNA _____ | 22 |
| 4.2 - Seleção de Primers e reação RAPD _____ | 23 |
| 4.3 - Leitura dos dados moleculares _____ | 24 |
| 4.4 - Estrutura genética de populações naturais de <i>P. hispidinervum</i> no Vale do Acre _____ | 24 |
| 4.4.1 - Material de estudo _____ | 24 |
| 4.4.2 - Leitura e análise dos dados _____ | 28 |
| 4.5 - Estimativa da taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia de uma população natural de <i>P. hispidinervum</i> _____ | 32 |
| 4.5.1 - Material de estudo _____ | 32 |
| 4.5.2 - Análise de dados _____ | 34 |
| 4.6 - Diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre _____ | 35 |
| 4.6.1 - Material de estudo _____ | 35 |
| 4.6.2 - Leitura e análise de dados _____ | 38 |
| 4.6.3 - Identificação taxonômica baseada em dados de marcadores RAPD _____ | 38 |
| 5. RESULTADOS _____ | 40 |
| 5.1 - Estrutura genética de populações naturais de <i>Piper hispidinervum</i> no Vale do Acre _____ | 40 |
| 5.2 - Taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia na população natural de <i>Piper hispidinervum</i> de Assis Brasil _____ | 52 |

| | |
|--|----|
| 5.3 - Diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre | 56 |
| 5.3.1 - Identificação taxonômica, via marcador RAPD | 59 |
| 6. DISCUSSÃO | 63 |
| 6.1 - Estrutura genética de populações naturais de <i>P. hispidinervum</i> no Vale do Acre | 63 |
| 6.2 - Taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia de uma população natural de <i>Piper hispidinervum</i> | 69 |
| 6.3 - Diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa | 71 |
| 6.3.1 - Relacionamento genético entre genótipos | 72 |
| 6.3.2 - Identificação taxonômica | 73 |
| 6.4 - Implicações para uso e conservação da espécie <i>P. hispidinervum</i> | 74 |
| 7. CONCLUSÕES | 76 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |
| ANEXOS | 92 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| 01 - Visão geral de duas populações naturais de pimenta longa (<i>P. hispidinervum</i>) no município de Brasiléia. a) Ramal 13; b) Ramal 17. | 26 |
| 02 - Mapa do Vale do Rio Acre (estado do Acre), identificando a localização das populações naturais de pimenta longa estudadas. | 27 |
| 03 - Viveiro de mudas de pimenta longa, formadas para estimativa da taxa de cruzamento, destacando as mudas formadas para obtenção das progênes oriundas das plantas-mãe 1, 2, 3 e 4 amostradas na população natural de Assis Brasil..... | 33 |
| 04: Mapa Administrativo do estado do Acre indicando os pontos de coleta de germoplasma de pimenta longa (foto cedida pelo governo do estado do Acre). | 36 |
| 05 - Padrão de bandas (marcadores) amplificadas com o <i>primer</i> OP-D11 e indivíduos das populações naturais de pimenta longa de Acrelândia, Senador Guiomard, Xapuri Araci e Xapuri Marcos. As setas indicam um dos locos RAPD analisados..... | 41 |
| 06 - Distribuição dos marcadores RAPD em cada população natural de pimenta longa avaliada, indicando a porcentagem de marcadores RAPD presente na população em relação ao total de marcadores avaliados e a porcentagem de marcadores exclusivos a cada população, em relação ao número total de marcadores presentes na população. | 42 |
| 07 - Porcentagem de marcadores RAPD polimórficos em cada população natural de pimenta longa avaliada no Vale do Acre..... | 42 |
| 08 - Distribuição espacial e grau de polimorfismo das populações naturais de pimenta longa no Vale do Acre. O tamanho das esferas é proporcional ao grau de polimorfismo. | 43 |
| 09 - Dendrograma do agrupamento das distâncias genéticas (F_{ST}) entre pares de populações, pelo método UPGMA. Pop 1: Acrelândia; Pop 2: Assis Brasil; Pop 3: Brasiléia, ramal 13 da BR 317; Pop 4: Brasiléia, ramal 17 da BR 317; Pop 5: Brasiléia, ramal 54 da BR 317; Pop 6: Brasiléia, ramal 78 da BR 317; Pop 7: Bujari; Pop 8: Capixaba, alcobaça; Pop 9: Capixaba, ramal Bolívia; Pop 10: Plácido de Castro; Pop11: Senador Guiomard; Pop 12: Xapuri, Araci; Pop 13: Xapuri, Marcos..... | 44 |
| 10 - Dendrograma do agrupamento das distâncias genéticas de Nei (1972) entre populações, pelo método UPGMA. Pop 1: Acrelândia; Pop 2: Assis Brasil; Pop 3: Brasiléia, ramal 13 da BR 317; Pop 4: Brasiléia, ramal 17 da BR 317; Pop 5: Brasiléia, ramal 54 da BR 317; Pop 6: Brasiléia, ramal 78 da BR 317; Pop 7: Bujari; Pop 8: Capixaba, alcobaça; Pop 9: Capixaba, ramal Bolívia; Pop 10: Plácido de Castro; Pop11: Senador Guiomard; Pop 12: Xapuri, Araci; Pop 13: Xapuri, Marcos..... | 45 |
| 11 - Número de marcadores RAPD privados observados em cada população de pimenta longa e nas regiões do Alto Acre e Baixo Acre..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 12 - Frequências alélicas de cada loco RAPD analisado para as populações naturais de pimenta longa das regiões do Alto Acre e Baixo Acre. | 47 |
| 13 - Distribuição da distância genética (f_{ST}) entre pares de populações naturais de pimenta longa do Vale do Acre em relação à distância geográfica das mesmas. | 50 |
| 14 - Distribuição da distância genética (f_{ST}) entre pares de populações naturais de pimenta longa do Alto Acre em relação à distância geográfica das mesmas. | 51 |
| 15 - Distribuição da distância genética (f_{ST}) entre pares de populações naturais de pimenta longa do Baixo Acre em relação à distância geográfica das mesmas. | 51 |
| 16 - Padrão de bandas (marcadores) amplificadas para as progênies 14 e 01, com o primer OP-AA11 (A e B) e para as progênies 08 e 09, com o primer OP-D11 (C e D), da população natural de pimenta longa de Assis Brasil. As setas indicam os marcadores avaliados. | 54 |
| 17 - Padrão de bandas (marcadores) amplificadas com o primer OP-B12. Os números de 1 a 49 indicam os genótipos e M = 1Kb ladder. As setas a e b indicam marcadores diagnósticos para <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i> , respectivamente. | 57 |
| 18 - Total de marcadores amplificados e polimórficos para as espécies <i>P. hispidinervum</i> e <i>P. aduncum</i> , utilizando-se seis primers. | 58 |
| 19 - Dendrograma da similaridade de Jaccard entre os genótipos, pelo método UPGMA. | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| 01. Identificação e localização das populações naturais de <i>P. hispidinervum</i> avaliadas no Vale do Acre..... | 27 |
| 02. Quadro da análise de variância molecular..... | 29 |
| 03. Identificação dos genótipos de pimenta longa avaliados na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, indicando a espécie, procedência, rendimento de óleo e teor de safrol no óleo de cada genótipo. | 37 |
| 04. <i>Primers</i> utilizados para análise da estrutura genética de populações naturais de pimenta longa, com suas seqüências de bases nucleotídicas e número de marcadores amplificados e polimórficos. | 40 |
| 05. Resumo da análise de variância molecular (AMOVA) e estimativas de fluxo gênico (Nm) calculadas pelo método de Wright (1931)..... | 48 |
| 06. Estimativas da variação genética entre populações como um todo, entre regiões, entre populações dentro de regiões e entre populações de cada região, calculadas pela estatística- q e estimativa do fluxo gênico aparente em função de q_T | 49 |
| 07. <i>Primers</i> utilizados para estimativas dos parâmetros populacionais do sistema de cruzamento da população natural de pimenta longa de Assis Brasil, com suas respectivas seqüências de bases nucleotídicas bem como o número de marcadores amplificados e analisados. | 53 |
| 08. Teste de qui-quadrado para aderência de cada loco RAPD ao modelo misto de reprodução. Locos em negrito foram excluídos da análise das estimativas das taxas de cruzamento por não aderirem ao modelo misto de reprodução..... | 53 |
| 09. Estimativas das taxas de cruzamento multilocos (t_m) e o erro padrão para cada família amostrada na população natural de pimenta longa de Assis Brasil. | 55 |
| 10. Freqüência alélica e erro padrão para cada loco RAPD avaliado na população natural de pimenta longa de Assis Brasil..... | 55 |
| 11. Estimativa do coeficiente de endogamia f para a população natural de pimenta longa de Assis Brasil. | 56 |
| 12. Total de marcadores RAPD amplificados, analisados e polimórficos para cada primer avaliado com todos os genótipos da Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre. | 56 |
| 13. Freqüência dos marcadores RAPD para cada <i>primer</i> e grupos taxonômicos. | 61 |

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervum* C.DC.) VISANDO SEU USO E CONSERVAÇÃO

Autora: LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA WADT

Orientador: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

RESUMO

A pimenta longa (*Piper hispidinervum*) é uma arvoretinha encontrada em áreas antropizadas, no estado do Acre, de alto valor econômico. Recentemente, o interesse por esta planta foi despertado por parte das indústrias de cosméticos e inseticidas devido ao safrol obtido do óleo essencial extraído de suas folhas e ramos finos. Diante deste fato, a domesticação e manejo da espécie vêm sendo desenvolvidos para se definir o melhor sistema de cultivo. Estudos sobre a diversidade genética e sua distribuição em populações naturais de pimenta longa são de extrema importância para a definição de estratégias adequadas de manejo e cultivo, porém não existem, na literatura, estudos dessa natureza. Este trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura genética de treze populações naturais de *P. hispidinervum* do Vale do Acre; estimar a taxa de cruzamento preferencial de uma população natural; e avaliar a diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, por meio de marcadores RAPD. A espécie *P. hispidinervum* apresentou altos níveis de diversidade genética, sendo esta estruturada no espaço segundo um padrão de isolamento por distância. A maior parte da variabilidade genética esteve entre indivíduos dentro de populações, porém a diferenciação entre populações, como um todo, foi alta ($q_p = 0,25$). O agrupamento das populações, em função da distância genética f_{ST} entre elas, mostrou dois grupos distintos, os quais representam as regiões do Alto Acre e Baixo Acre. A AMOVA mostrou que 20,61% da variabilidade total está entre essas duas regiões. Embora as estimativas de fluxo gênico aparente (Nm) tenham dado valores inferiores a um, a estruturação genética observada foi atribuída a diferentes histórias de vida das populações e não à restrição de fluxo gênico. A taxa de cruzamento multilocus foi

estimada em 1,033, evidenciando que a espécie é preferencialmente alógama. A estimativa do coeficientes de endogamia f não diferiu de zero e os cruzamentos ocorreram preferencialmente entre indivíduos não-aparentados. Os dados obtidos sugerem que estratégias de domesticação e cultivo da pimenta longa devem levar em consideração possíveis efeitos de depressão por endogamia. A diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre foi elevada, sendo as espécies *P. aduncum* e *P. hispidinervum* muito diferentes geneticamente, em que a primeira apresentou padrão similar ao esperado para uma espécie autógama e a segunda, padrão de alogamia. Dos dezesseis genótipos não-identificados botanicamente, nove puderam ser identificados como *P. hispidinervum* e outros seis se mostraram similares a esta espécie, sendo considerados como ecótipos.

GENETIC STRUCTURE STUDIES ON A LONG PEPPER (*Piper hispidinervum* C.DC.) NATURAL POPULATION FOR EXPLOITATION AND CONSERVATION

Author: LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA WADT

Advised: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

SUMMARY

Long pepper (*Piper hispidinervum*) is a small tree with high commercial value found in antropic areas in the State of Acre. Recent interest in this plant by cosmetic and insecticide industries was motivated by the safrole contained in the essential oil extracted from its leaves and fine twigs. Domestication and agricultural management studies on the species have been developed to define the best cultivation system. Assessments on long pepper genetic diversity and its distribution in the natural populations are extremely important to define suitable management and cultivation strategies. However, no reports are yet available in the literature. The objectives of this study were: a) to assess the genetic structure of thirteen natural *P. hispidinervum* populations of the Acre Valley; b) to estimate the preferential cross pollination rate of a natural population; and, c) to evaluate the genetic diversity sampled in the Long Pepper Germplasm Collection at Embrapa Acre, using RAPD markers. The *P. hispidinervum* species showed high levels of genetic diversity spatially structured according to an isolation by distance pattern. Most of the detected genetic variability was among individuals within the populations, but the differentiation among populations was high ($q = 0.25$). Population clustering as function of their genetic distances (f_{ST}) formed two distinct groups that represented the High Acre and Low Acre regions. The AMOVA procedure showed that 20.61% of the total variability was among these two regions. Although the values of the apparent genetic flow estimates (Nm) were smaller than one, the observed genetic structure was attributed to a different life history of the populations and not to a restriction in the gene flow. The multilocus crossing rate was estimated at 1.033 showing that the species is preferentially allogamic. The estimate of the f

inbreeding coefficient did not differ from zero and the crosses occurred preferentially among unrelated individuals. The obtained data suggested that long pepper domestication and cultivation strategies should consider possible inbreeding depression effects. The genetic diversity represented in the Long Pepper Germplasm Collection at Embrapa Acre was high. However, the *P. aduncum* and *P. hispidinervum* species are genetically very different showing patterns similar to those expected for self pollinating and for open pollinating species, respectively. Nine of the sixteen genotypes which were not botanically identified could be classified as *P. hispidinervum* by the RAPD analysis and another six ones showed characteristics similar to those of the species and were considered to be ecotypes.

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é reconhecida mundialmente por abrigar uma das maiores fontes de recursos naturais, sendo por isso considerada a região de maior biodiversidade animal e vegetal (McNeely et al, 1990). O estado do Acre está inserido na porção ocidental da Amazônia Brasileira, sendo de grande importância para a conservação da Floresta Tropical por possuir tipologias representantes tanto da Amazônia Central como Subandina.

O Acre é considerado um estado tipicamente florestal (cerca de 90% de seu território é coberto por florestas primárias), tendo grande parte de suas florestas pertencente a Unidades de Conservação como: Reservas Extrativistas, Reservas Indígenas, Florestas Nacionais e Reservas Biológicas, além de possuir vários projetos de assentamento extrativistas e de colonização. Diante desse quadro, seu desenvolvimento passa, necessariamente, pelo uso racional dos recursos naturais existentes na região e desenvolvimento agroindustrial para produtos da floresta.

A época atual é marcada por diversos conflitos entre o crescimento industrial/tecnológico e a conservação dos recursos naturais. Uma visão imediatista, buscando recursos a curto prazo, leva a uma contínua e progressiva devastação florestal, causando sérias conseqüências ao ambiente e ao homem. Devido a esses fatos, o interesse por questões ambientais e a pesquisa sobre espécies nativas têm aumentado consideravelmente, com maior ênfase para aquelas com algum interesse fitoquímico.

A maioria das espécies amazônicas de interesse fitoquímico são ervas ou arbustos que colonizam áreas abandonadas ou sub-bosque da floresta, tendo ainda aquelas que são invasoras de áreas cultivadas. A diversidade de habitats e do modo de vida dessas espécies é elevada e, portanto, a domesticação de qualquer espécie nativa passa

inicialmente pela caracterização botânica e genética do recurso natural; conhecimento de sua distribuição geográfica e comportamento ecológico; e identificação de indivíduos-matrizes para produção de sementes.

O extrativismo tradicional de plantas fitoterápicas baseia-se na extração indiscriminada, sem nenhuma preocupação com a regeneração e sustentabilidade da produção. Esta atitude levou à escassez de muitos recursos naturais, ocasionando uma redução da oferta do produto bruto (raízes, folhas, ramos e caules) no mercado industrial. Para que haja a sustentabilidade tão almejada atualmente, é necessário desenvolver sistemas de manejo adequados e/ou domesticar as espécies com potencial de mercado. O processo de domesticação passa por várias etapas, desde a identificação e caracterização do material botânico até o conhecimento de suas exigências ambientais no habitat natural e respostas fisiológicas às condições de cultivo racional (Santiago, 1999).

Uma espécie vegetal que tem despertado o interesse de empresários do ramo de fitoquímicos utilizados nas indústrias de cosméticos e bioinseticidas é a pimenta longa (*Piper hispidinervum*). A pimenta longa é um recurso natural, encontrado no estado do Acre, de grande valor comercial devido ao alto teor de safrol em seu óleo essencial. Naturalmente esta espécie tem sido encontrada em áreas antropizadas, podendo ser considerada uma pioneira antrópica (Almeida, 1999). Muitos agricultores, desconhecendo seu potencial, consideravam a pimenta longa uma praga e várias foram as tentativas para exterminá-la de suas propriedades, pois ocorre em áreas de pousio, formando populações de grande densidade (Sousa, 1997), dominantes sobre as demais espécies (Oliveira & Lunz, 1996; Sousa, 1997).

O sistema de cultivo ou manejo da pimenta longa ainda não está bem definido. Devido ao grande interesse econômico e ocorrência natural no estado do Acre, percebe-se a importância de estudos básicos para domesticação e manejo dessa espécie. Sua domesticação ainda está em fase de desenvolvimento, sendo que a Embrapa Acre tem realizado estudos para a definição do sistema de cultivo. Definido o sistema de cultivo, certamente surgirão demandas por sementes de materiais com alta produtividade de

safrol e resistentes a pragas e doenças. Diante desse quadro, é fundamental ter um programa de melhoramento genético em andamento para suprir esta demanda.

A base para qualquer programa de melhoramento é, sem dúvida, a variabilidade genética. Portanto, conhecer a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações nativas de pimenta longa (*P. hispidinervum*) é fundamental para o estabelecimento de estratégias adequadas de coleta dos recursos genéticos e direcionamento de cruzamentos. Para o melhoramento, informações sobre as diferenças genéticas entre indivíduos de uma população e o estabelecimento de relações genéticas entre diferentes acessos de uma coleção de germoplasma são fundamentais para auxiliar o melhorista na tomada de decisões. A determinação da forma preferencial de acasalamento também é fundamental para a escolha do método de melhoramento mais adequado, pois existem métodos específicos para os diferentes sistemas reprodutivos (Dias & Kageyama, 1982).

O presente trabalho assume a seguinte hipótese como sendo verdadeira: o sistema preferencial de acasalamento, da pimenta longa, é por fecundação cruzada (alógama) e, portanto, a variabilidade genética dentro de populações deve ser maior que entre populações.

2. OBJETIVOS

- Avaliar, por marcadores RAPD, a estrutura genética de populações naturais de pimenta longa do Vale do Rio Acre;
- Estimar o sistema preferencial de cruzamento e o coeficiente de endogamia de uma população de pimenta longa, por meio de marcadores RAPD;
- Avaliar a diversidade genética existente na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre;
- Propor estratégias para o uso e conservação da espécie *Piper hispidinervum*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Considerações gerais

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, cujos representantes são de distribuição pantropical e de hábito predominantemente herbáceo. As folhas são sempre inteiras, predominando a disposição alternada. Geralmente, o caule é articulado e as inflorescências especiformes com flores muito pequenas e hermafroditas. Na família Piperaceae estão incluídos cerca de dez gêneros, sendo *Piper* e *Peperomia* os principais da flora brasileira (Joly, 1993; Agarez et al., 1994). Embora o número de espécies descritas nessa família seja elevado, há uma variação muito grande, sendo estimado de 1.400 a mais de 2.000 espécies, e dentre essas a maior parte se encontra nos gêneros *Piper* e *Peperomia* (Cronquist, 1981).

No gênero *Piper*, encontram-se mais de 700 espécies distribuídas em regiões Tropicais e Subtropicais do mundo inteiro. A maioria das espécies desse gênero possui uso na medicina tradicional, além de despertar o interesse químico por vários tipos de componentes secundários. A espécie mais importante desse gênero é *Piper nigrum* (Pimenta-do-Reino), que vem sendo estudada desde 1819 quando foi isolada a piperina, o princípio pungente¹ dessa espécie usado em tratamentos de epilepsia (Sengupta & Ray, 1987).

Várias outras espécies de *Piper* apresentam componentes químicos de interesse farmacológico como, por exemplo: *P. guineense* (amidas com atividade antibacteriana); *P. aduncum* (óleo essencial com propriedades inseticidas) e *P. methysticum* (“Flavokawain C” com atividade contra *Salmonella typhi*) (Sengupta & Ray, 1987).

Uma outra espécie da Amazônia Ocidental Brasileira que vem despertando interesse da indústria nos últimos anos é a pimenta longa (*Piper hispidinervum*), por produzir um óleo essencial rico em safrol.

A função biológica dos óleos essenciais para a planta ainda não está muito clara, porém, acredita-se que estes exerçam funções de atração de insetos polinizadores, atuem como repelentes a inimigos naturais, ou, ainda, como anti-séptico e regulador do metabolismo (Silva, 1993). Geralmente, os óleos essenciais são produzidos e secretados por glândulas especiais, sendo armazenados em cavidades existentes entre as células.

O uso de óleos essenciais é muito antigo, havendo relatos de produção na Pérsia, Índia e Egito em épocas anteriores a Cristo. No final da Idade Média, a destilação de óleos essenciais para produção de óleos de enebro, romã, lavanda e trementina era bastante frequente (Peckolt, 1914, citado por Silva, 1993). Atualmente, o Brasil é um grande produtor de óleos essenciais e de alguns de seus componentes puros.

A grande maioria dos óleos essenciais existentes na Amazônia não possui valor econômico pelo simples desconhecimento de seus componentes químicos, ou mesmo pelas dificuldades de acesso, transporte ou qualidade do produto extraído. Esta situação faz com que o mercado seja incerto, influenciando diretamente no preço e na qualidade do produto. Em alguns poucos casos, a produção de óleos essenciais sustenta grandes indústrias como, por exemplo, perfumarias francesas e indústrias de fragrâncias cítricas.

O óleo essencial extraído da espécie *Piper hispidinervum* é rico em safrol (Maia, 1987). O safrol é um fenil éter (Tyler et al., 1982) com peso molecular de 162,18g e densidade, a 20⁰C, de 1,096 (Rocha & Ming, 1999), muito demandado pela indústria química devido a dois derivados: a heliotropina, amplamente utilizada como fragrância; e o butóxido de piperonila (PBO), um ingrediente essencial para inseticidas biodegradáveis à base de piretrum. A produção desses inseticidas não seria economicamente viável se não fosse o efeito sinérgico dado pelo PBO e, portanto, essa indústria química é dependente da disponibilidade contínua de PBO (Rocha & Ming, 1999). Além disso, o piretrum natural junto com o PBO é a única formulação permitida para uso em alimentos, pelos países do primeiro mundo (Arctander, 1960).

¹ Odor penetrante.

3.2 - Referencial histórico

No século IX, o safrol era utilizado na forma natural como óleo essencial extraído de raízes de *Sassafrás albidum* (Nutt) Nees, uma espécie arbórea nativa das montanhas apalaches nos Estados Unidos (Alencar, 1971), e por isso denominado de óleo de sassafrás. Esse óleo foi muito utilizado nos Estados Unidos para aromatizar cervejas, refrigerantes, sabões, ceras e desinfetantes (Anya, 1974; Anon, 1992). No Brasil, foi usado como ingrediente de bebidas populares como a pinga de sassafrás. Outra utilidade foi como tópico anti-séptico, porém esses usos não são indicados devido ao efeito carcinogênico do safrol (Rocha & Ming, 1999).

Posteriormente, o safrol passou a ser obtido de óleos essenciais extraídos, por arraste à vapor, da madeira de algumas espécies da família Lauraceae, sendo denominado de óleo sassafrás. No início do século XX, o Japão entrou no mercado internacional do óleo de sassafrás (extraído de *Cinnamomum canphora*), afetando a estabilidade das indústrias americanas. No entanto, o bloqueio mundial, ocorrido na década de 40, entre os países orientais e ocidentais devido à Segunda Guerra Mundial, estimulou a produção brasileira do óleo de sassafrás (Silva, 1993).

No Brasil, este óleo foi extraído da canela sassafrás (*Ocotea pretiosa*), uma Lauraceae nativa da Mata Atlântica, com alta densidade de indivíduos no Vale do Itajaí (SC). A descoberta do óleo de sassafrás extraído da canela se deu em 1939, quando foi evidenciado que pela destilação da madeira dessa árvore obtinha-se um óleo essencial contendo 84% de safrol (Rocha & Ming, 1999). A partir da década de 40, até os anos 60, o Brasil foi o maior exportador mundial de óleo de sassafrás, porém a exploração indiscriminada de canela sassafrás levou a um declínio na produção, fazendo com que ao final dos anos 80 os níveis de exportação brasileira caíssem consideravelmente.

Em 1991, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), por meio do decreto nº 1557 de 25/09/91, proibiu o corte de *O. pretiosa* em florestas primárias da Mata Atlântica devido ao risco iminente de extinção dessa espécie. Toda essa situação, aliada às restrições do governo chinês à exploração de

Cinnamomum sp., ocasionou uma queda na oferta mundial de safrol, elevando o preço do quilo de óleo essencial contendo safrol de US\$ 4,00, em 1990, para US\$ 13,00, em 91, e US\$ 20,00, em 92 (Gran page, 1992).

A partir daí, os únicos produtores mundiais de safrol passaram a ser a China e o Vietnã, obtendo-o do óleo essencial extraído de *Cinnamomum camphora*. Porém, como o processo de extração é feito pelo aniquilamento da fonte, sem reposição, os consumidores industriais se mostram preocupados com a disponibilidade deste componente químico natural a longo prazo (Pimentel et al., 1998). Atualmente, estima-se uma demanda de mais de 3.500 t de safrol/ano, sendo o litro comercializado a uma média de US\$ 7,00 (Pimentel, comunicação pessoal).

A descoberta da pimenta longa (*Piper hispidinervum*) como uma espécie promissora para a obtenção de safrol se deu na década de 70, por meio do programa de triagem de plantas aromáticas da Amazônia, coordenado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Porém, somente na década de 90, após a proibição do corte da canela sassafrás, foi que esta espécie começou a ser mais estudada, despertando o interesse para sua exploração comercial. Ao contrário do sistema de extração dos óleos essenciais das Lauraceae, que em todos os casos havia destruição da fonte, o processo de obtenção de safrol a partir da pimenta longa pode ser sustentável. No caso da pimenta longa, o safrol é extraído de folhas e ramos finos sem a destruição da planta, possibilitando sua rebrota (Silva, 1993). Outro fator que torna a pimenta longa interessante é o fato do rendimento de óleo (média de 3 a 4% em *P. hispidinervum* contra 1% em *Ocotea pretiosa*) e conteúdo de safrol no óleo extraído da espécie *P. hispidinervum* serem muito superiores aos encontrados nas demais espécies.

3.3 - Espécies de pimenta longa e ocorrência geográfica no estado do Acre

A Embrapa Acre junto com o Museu Emílio Goeldi, de Belém (PA), iniciaram em 1992 estudos de prospeção de pimenta longa, visando o zoneamento e caracterização de *habitats* naturais no estado do Acre (Pimentel et al., 1998). Como resultado desse trabalho, foram encontradas duas espécies: *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*, muito semelhantes botanicamente, porém somente a primeira apresentou altos teores de safrol

no óleo essencial. *P. hispidinervum* foi encontrada somente no Vale do Acre, associada a áreas antropizadas com solo predominantemente do tipo Podzólico Vermelho-Amarelo com textura média a pesada. *P. aduncum* foi mais abundante nos Vales do Juruá e Purus, mas também foi encontrada no Vale do Acre, associada às áreas de ocorrência da outra espécie.

Posteriormente, em 1994, a Embrapa Acre iniciou um subprojeto de pesquisa para coleta de material genético, implantação de uma coleção de germoplasma e identificação de genótipos superiores quanto ao rendimento de safrol. Nesse trabalho, foi identificada uma terceira espécie (*Piper hispidum*), também conhecida como pimenta longa, porém sem interesse comercial para a extração de safrol. Os resultados de teores de safrol para as três espécies foram os seguintes: *Piper hispidinervum*, com 87 a 97% de safrol; *Piper aduncum*, com teores de safrol variando de 0,10 a 3,24%; e *Piper hispidum* com menos de 0,5% (Silva & Oliveira, 2000a).

P. hispidum ocorreu em todo o estado, porém se observou uma preferência desta espécie por ambientes sombreados; as demais espécies foram encontradas nos mesmos habitats definidos por Pimentel et al. (1998). A caracterização botânica desse material foi feita no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RJ), onde foram identificadas as três espécies de *Piper*. No entanto, alguns exemplares, procedentes do município de Tarauacá (AC), não puderam ser identificados corretamente, havendo dúvidas se pertenciam à espécie *P. hispidinervum* ou *P. aduncum*, e por isso foram denominados de *P. affinis hispidinervum*. Um estudo sobre a composição química do óleo essencial extraído dos indivíduos da Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, procedentes de Tarauacá, demonstrou uma baixa proporção de safrol (18,4%) e o componente mais abundante foi o sarisan, com 74,3%. Devido a esses resultados, os autores sugerem uma revisão na classificação desses indivíduos e enquanto não se tem resultados definitivos, os mesmos propõem a denominação de *Piper affinis hispidinervum* (Bizzo et al., no prelo).

3.4 - Descrição botânica de *Piper hispidinervum*

A espécie *Piper hispidinervum* (C.DC.) é um arbusto com altura de 2 a 7 metros, bastante nodoso, encontrada no estado do Acre em áreas antropizadas. Segundo Van den Berg (1983), suas folhas são membranáceas ou cartáceas, elípticas, elíptico-ovaladas ou elíptico-lanceoladas, com comprimento variando de 5 a 10 cm e largura de 4 a 7 cm; ápice curtamente acuminado, com base assimétrica arredondada ou cordiforme, opacas em ambas as faces, sendo a inferior pouco pubescente; as espigas são alongadas, com comprimento de 7 a 14 cm e 2,5 a 3,5 mm de diâmetro, sendo as flores minúsculas e frutos obpiramidais.

Na caracterização botânica descrita em Silva & Oliveira (2000a), observam-se algumas diferenças, principalmente quanto ao tamanho e forma da folha. Neste trabalho, a descrição encontrada é a seguinte:

“*Piper hispidinervum* é arbustivo com ramos não-pubescentes, com pecíolo variando de 0,1 a 0,2 cm de comprimento, de folhas oblongo-lanceoladas ou oblongo-elípticas, variando de 14,5 a 22 cm de comprimento e de 4 a 7 cm de largura; ápice acuminado a levemente cuspidado; base oblíqua a inequilátera; folhas levemente ásperas na face ventral; espigas de tamanho semelhante ao das folhas, com pedúnculos curtos, próximos a 1 cm de comprimento; bractéolas pedicelado-peltadas; quatro estames sem anteras e três estigmas sésseis”.

3.5 - Características ecológicas de *Piper hispidinervum*

O processo de sucessão em áreas florestais corresponde à recuperação de clareiras ou áreas desmatadas, oriundas por diversos tipos de perturbação (Kageyama & Gandara, 1994). O tamanho da área perturbada afeta o microclima local que, por sua vez, determina o estabelecimento de diferentes espécies em função do grupo ecológico a que pertencem (Kageyama et al., 1992a). Para Saldarriaga (1994), o tamanho da clareira determina o grupo de espécies que ocupará a área, sendo que em clareiras inferiores a 200 m² ocorrem espécies de bosque maduro, e em áreas superiores a 1.000 m², espécies típicas de ambientes abertos. Whitmore (1978) faz as mesmas colocações, dizendo que

clareiras grandes são colonizadas por espécies ausentes no sub-bosque, aptas a explorar ambientes abertos.

Várias são as classificações ecológicas dadas às espécies, porém a maioria delas considera a exigência de luz para germinação e desenvolvimento da planta. Segundo a classificação ecológica de Budowski (1965), espécies pioneiras e secundárias iniciais são aquelas que germinam e se desenvolvem a pleno sol, produzem sementes precocemente, sendo estas de tamanho pequeno, em muita quantidade, e dispersas por pássaros, morcegos ou vento. Denslow (1980) classifica as espécies em especialistas de clareiras grandes, clareiras pequenas e de sub-bosque, em função da tolerância à sombra para germinação e desenvolvimento das plantas. Já Whitmore (1978) classifica em apenas dois grupos ecológicos contrastantes, o das tolerantes à sombra e das exigentes à luz na fase inicial.

Segundo resultados obtidos em laboratório, *Piper hispidinervum* é típica de ambientes abertos com incidência direta de luz, apresentando sementes com baixa longevidade em condições de ambiente natural; em áreas de pastagem, apresenta banco de sementes restrito, com dispersão durante o ano todo, tendo picos de produção de sementes em janeiro/fevereiro e junho/julho (Almeida, 1999). Desta forma, *P. hispidinervum* foi considerada uma espécie pioneira antrópica, por colonizar áreas abertas fora da floresta, preferindo ambientes perturbados.

No trabalho de zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa, observou-se que a maioria dos locais de ocorrência era de pastagens abandonadas ou degradadas, não havendo indícios de sua ocorrência em florestas primárias ou secundárias (Pimentel et al., 1998), embora não se tenha relatos de estudos para verificar sua ocorrência em áreas florestais.

P. hispidinervum tem se mostrado como uma espécie adaptada a locais quentes e úmidos, ocorrendo naturalmente em regiões com elevado índice pluviométrico e clima do tipo Ami e Awi. Em experimentos onde foi testado a exigência hídrica para germinação de sementes, foi verificado que a espécie germina tanto em condições hídricas padrões quanto em ambiente totalmente encharcado (Almeida, 1999).

Estudos sobre a produção e dispersão de sementes de *P. hispidinervum* (Silva & Oliveira, 2000b) revelaram que o isolamento de indivíduos leva a uma queda na produção de sementes de cerca de 77%, e que o impedimento de cruzamento, por meio do ensacamento de espiguetas, causa uma redução média de 80% no número de sementes produzidas em relação a espiguetas não-ensacadas. Estes resultados evidenciam uma forte depressão por endogamia afetando a produção de sementes. A baixa produção de sementes em indivíduos isolados ou espiguetas ensacadas caracteriza a existência de um certo grau de auto-incompatibilidade. Quanto à dispersão de sementes, observou-se que quanto maior a distância da planta-mãe, maior o número de sementes dispersas, evidenciando que a dispersão deve ser feita por aves ou morcegos. Almeida (1999) também sugere que a dispersão de sementes desta espécie deve ser feita por morcegos.

3.6 - Estrutura genética de populações

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. Esta estrutura resulta da combinação entre mutação, migração, seleção e deriva genética, as quais definem a distribuição da variabilidade genética nas populações. Em populações naturais, a distribuição da variabilidade genética é influenciada pelo modo de reprodução, sistema de acasalamento, tamanho da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (Hamrick, 1982), além de ser estruturada no tempo e no espaço.

Os parâmetros mais utilizados para quantificar a variação genética são as proporções de locos polimórficos dentro de espécies (P_e) e dentro de populações (P_p) e a diversidade geral de espécie (H_e) e de populações (H_p) (Hamrick, 1994b). A distribuição dessa variação dentro e entre populações pode ser estimada pelas estatísticas F de Wright ou G_{ST} de Nei. No entanto, a escala na qual a estrutura genética é considerada torna-se importante, pois diferentes padrões podem ser obtidos dependendo da importância relativa dos fatores que afetam a estrutura genética em determinada escala espacial. Modelos de autocorrelação espacial também podem ser usados para avaliar a estrutura genética de populações (Epperson, 1995; Slatkin, 1985).

Espécies arbóreas da floresta tropical apresentam alta proporção de locos polimórficos e elevados níveis de diversidade genética dentro de espécies. De maneira geral, a maior parte da variação genética é mantida dentro de populações e não entre elas (Hamrick, 1994a,b). Hamrick (1994b), avaliando dez espécies arbóreas tropicais, verificou que a variação genética entre populações foi muito baixa ($G_{ST} = 0,05$). Em outro estudo, *Cecropia obtusifolia* e *Acacia mexicanum* também apresentaram baixos níveis de variação entre populações, com valores de F_{ST} iguais a 0,029 e 0,040, respectivamente (Alvarez-Buylla & Garay, 1994; Eguiarte et al., 1992). Por outro lado, Moraes (1993), estudando a variabilidade genética de duas populações de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), verificou, para as duas populações, uma baixa taxa de fecundação cruzada, ocasionando expressiva taxa de endogamia (homozigose).

Para a espécie *Piper betle*, a diversidade genética entre 27 genótipos foi significativa, havendo a formação de dez grupos distintos, os quais não seguiram o padrão de origem geográfica dos genótipos, indicando que o isolamento geográfico não teve grandes influências na diversidade (Rahaman et al., 1997).

Nicotra et al. (1997), avaliando o efeito da luz na variação genética e plasticidade fenotípica de duas espécies de *Piper* com diferentes comportamentos ecológicos, uma pioneira e outra tolerante à sombra, verificaram que nenhuma das espécies mostrou efeito significativo dos genótipos em resposta à luz, sendo que as duas espécies apresentaram padrão similar de variação genética. Estes resultados sugerem que as similaridades encontradas devem ser mais devido à relação filogenética do que em função da distribuição ecológica.

Para algumas espécies arbóreas tropicais, Hamrick et al. (1993) encontraram que indivíduos próximos têm mais alelos em comum do que aqueles mais distantes, porém a estrutura de família tendeu a desaparecer nos estágios mais avançados do ciclo de vida. Estudos de autocorrelação espacial de *Cecropia obtusifolia* revelaram uma forte estrutura genética de plântulas dentro de clareiras, enquanto que esta estrutura foi menos evidente nos estágios de vida mais avançados, embora fosse mantido até a idade adulta (Alvarez-Buylla et al., 1996a). Os autores atribuíram esses resultados à limitada ou correlacionada dispersão de sementes. Padrões da estrutura genética local para esta

espécie, avaliado por estimativas de F_{ST} , mostraram que a diferenciação genética entre “patches 2” foi alta, sugerindo que a dinâmica de clareiras teve efeito significativo sobre a estrutura genética microespacial da espécie (Alvarez-Buylla et al., 1996b). O padrão local desta espécie contrasta fortemente com o padrão macroregional (até 130 Km), o qual apresentou $F_{ST} = 0,029$, mostrando ausência de estrutura genética (Alvarez-Buylla & Garay, 1994).

O fluxo gênico ou a dispersão de pólen e sementes entre populações estabelecidas reduz a diferenciação genética entre elas, sendo um dos mecanismos responsáveis pela introdução de novas variações genéticas na população receptora (Wright, 1931). A taxa de fluxo gênico pode ser medida em termos do número equivalente de migrantes que se move de uma população a outra (Silvertown & Doust, 1993). Existem quatro modelos propostos para explicar o fluxo gênico entre populações: o modelo continente-ilha, em que o fluxo de alelos ocorre em uma única direção, partindo de uma população grande para uma população menor e isolada; o modelo de ilhas, onde o movimento de alelos se dá ao acaso, em qualquer direção, entre um grupo de pequenas populações; o modelo *stepping stone*, onde o fluxo gênico ocorre apenas entre populações vizinhas; e o modelo de isolamento por distância, o qual considera uma população contínua onde o fluxo de alelos ocorre entre vizinhos próximos (Perecin, 2000).

O movimento de alelos ocorre via gametas ou sementes, porém a efetiva troca de genes entre populações ou demes, medida pela taxa de migração m , geralmente é menor que o número de gametas ou sementes transportados, visto serem dependentes da taxa de sobrevivência e representatividade genética dos imigrantes (Futuyma, 1992). O recrutamento de novos indivíduos em populações com intenso fluxo gênico é dependente das características das populações envolvidas, sendo que uma depende da outra. Assim, duas populações nestas condições podem ser consideradas como uma única população, evidenciando que o fluxo gênico não só influencia a estrutura genética como também define os limites da própria população (Nason et al., 1996).

Estimativas de fluxo gênico podem ser feitas por métodos diretos ou indiretos. Slatkin (1987) recomenda o uso desses dois métodos conjuntamente, por produzirem

² Aglomerados, agregados, agrupamentos, grupos.

informações diferentes e complementares. Os métodos diretos utilizam-se de estimativas das distâncias de dispersão e do sucesso no estabelecimento de imigrantes, enquanto que os métodos indiretos usam as frequências alélicas ou medidas de diferenças genéticas para estimar o fluxo gênico. Estudo sobre taxas de fluxo gênico em espécies com diferentes síndromes de polinização revelou que, para espécies predominantemente de autopolinização, o fluxo gênico médio foi de 0,83; para espécies polinizadas por animais esse fluxo foi, em média, de 1,21, enquanto que em espécies polinizadas pelo vento, o fluxo gênico foi de 2,91 (Govindaraju, 1988, citado por Silvertown & Doust, 1993). Variações nas taxas de fluxo gênico observadas para *Raphanu*, *Cucurbita* e outras espécies sugerem que a taxa de fluxo gênico está relacionada mais com a população do que com a espécie em si (Ellstrand et al., 1989, citado por Silvertown & Doust, 1993). Hamrick & Loveless (1989) verificaram que o potencial para o movimento de genes e valores de fluxo gênico, calculados pela variação entre populações (G_{ST}), foram altamente correlacionados.

Outros estudos, em que o fluxo gênico foi avaliado com base em análise de paternidade, mostram que há um grande potencial para a dispersão de pólen a grandes distâncias. No entanto, Boshier et al. (1995), utilizando análise de paternidade, verificaram um aumento nos acasalamentos entre indivíduos de *Cordia alliodora* geneticamente correlacionados, e outro estudo realizado com *Cecropia obtusifolia* exibiu um padrão de isolamento por distância em escala local, pois a maior parte dos acasalamentos ocorreu entre vizinhos próximos (Alvarez-Buylla et al., 1996a)

Outro fator que afeta a estrutura genética de uma população e apresenta efeitos contrários ao fluxo gênico é a deriva genética. A deriva genética se refere a mudanças nas frequências alélicas devido à amostragem aleatória de gametas (Wright, 1969), levando à perda de diversidade genética. A importância relativa da deriva genética comparada com outras forças evolutivas diz respeito ao tamanho efetivo da população (N_e). O N_e é definido como o número efetivo de indivíduos reprodutivos que podem ser encontrados dentro de uma área de vizinhança genética (Silvertown & Doust, 1993).

O tamanho da população é uma característica importante a ser considerada quando se avalia o efeito da deriva genética, pois a perda de diversidade genética, devido à

deriva, será maior em populações de menor tamanho, enquanto que este efeito, em populações grandes, passa a ser desprezível. Se após uma redução no tamanho da população, seu número de indivíduos for recuperado rapidamente, o efeito da deriva será menor do que se a população for mantida constantemente pequena (Barret & Kohn, 1991).

Em muitos casos, o tamanho da população (N) é menor que o N_e devido principalmente a: flutuações no tamanho da população; variação no sucesso reprodutivo dos indivíduos; distribuição diferenciada de sexo e sobreposição de gerações (Crawford, 1984). A taxa N_e/N varia entre 0,25 e 1,00 para animais (Nunney & Campbell, 1993), enquanto que, em plantas, essa taxa tem sido menor por causa da condição sésil dos vegetais; dispersão limitada de pólen e sementes; e autofecundação parcial ou total (Crawford, 1984).

Estimativas de N_e assumem a existência de uma população discreta, porém em condições naturais nem sempre é possível delimitar um grupo discreto de indivíduos. Assim, o tamanho da população é estimado pelo tamanho da vizinhança (N_b), o qual é definido como um grupo equivalente a uma unidade panmítica dentro de uma distribuição contínua de indivíduos (Crawford, 1984).

Estimativas de N_e variam em função do método e poucas são as espécies florestais em que foram estimados os valores de N_e . As estimativas de N_b baseiam-se no número efetivo de imigrantes (Nm) por geração, em uma população, e são obtidas a partir da estatística F_{ST} de Wright (Slatkin & Barton, 1989). Para *Cecropia obtusifolia*, uma pioneira, foram encontrados valores de N_b variando de 19,4 a 87,4 (Alvarez-Buylla et al., 1996a). Devido à relação entre o tamanho efetivo e a perda de variação genética, Hamrick & Murawski (1991) compararam dados de espécies florestais comuns (alta densidade) com não-comuns (raras) e observaram que a menor diversidade genética é mantida em populações menos densas. Concluíram, ainda, que isso se deve ao provável pequeno tamanho efetivo das populações de espécies menos comuns, porém o N_e não foi estimado e isto não significa que estimativas de densidade refletem características da espécie e seu tamanho efetivo. Alvarez-Buylla et al. (1996a) colocam que a densidade

populacional pode ser um indicador parcial do tamanho de vizinhança, caso a distribuição da população seja uniforme.

Kawaguici (1999), avaliando a variação genética de adultos, jovens e plântulas de *Calophyllum brasiliense*, detectou, em função do N_e estimado, que a maior parte da variabilidade genética estava representada nas plântulas, onde ocorre maior densidade de indivíduos. Neste mesmo trabalho, o autor concluiu que quanto maior o índice de fixação e a diferença na proporção entre sexos menor é a representatividade genética nos grupos.

Outro fator de grande importância, que afeta a variação genética e sua distribuição entre e dentro de populações, é o sistema de acasalamento da espécie. O sistema de acasalamento determina o modo de transmissão dos genes de uma geração para outra, o qual pode ser por autofecundação, fecundação cruzada ou misto. A taxa de cruzamento pode influenciar no grau de isolamento entre demes de uma população contínua devido ao seu efeito sobre a área de vizinhança, pois baixas taxas de cruzamento (t) reduzem a área de vizinhança, enquanto que para $t=1$ essa área é máxima (Crawford, 1984).

A relação entre o sistema de acasalamento e deriva genética, principalmente no que diz respeito à depressão por endogamia, é uma importante questão a ser considerada na conservação de recursos genéticos, pois populações pequenas geralmente sofrem endogamia. Endogamia significa o acasalamento de indivíduos que são relacionados por ascendência (Falconer, 1987), ou seja, diz respeito a homozigotos que possuem alelos idênticos por ascendência. Altos níveis de endogamia não resultam necessariamente em depressão, pois a depressão por endogamia depende principalmente de mecanismos genéticos e da história de vida da espécie (Barret & Kohn, 1991; Charlesworth & Charlesworth, 1987).

Em alguns casos, a carga genética é purificada pelos efeitos da endogamia. Isto ocorre após várias gerações de intensa endogamia, quando os efeitos deletérios são causados por alelos recessivos deletérios ou letais, porém nem sempre essa purificação é fácil. Por outro lado, se a depressão por endogamia for causada por locos sobredominantes, os efeitos deletérios deverão aumentar com a taxa de autofecundação. Apenas nos casos de sobredominância assimétrica a depressão por

endogamia é eventualmente eliminada devido à perda de alelos menos adaptados (Barret & Kohn, 1991; Charlesworth & Charlesworth, 1987).

A endogamia leva à homoziguidade, o que geralmente causa perda de adaptabilidade. Os mecanismos que controlam a relação entre heteroziguidade e adaptabilidade têm sido objeto de intensiva pesquisa e ainda são muito discutidos. Muitas espécies animais e vegetais exibem heterose, na qual a maioria dos indivíduos heterozigotos tem melhor desempenho que os homozigotos. Existem duas hipóteses principais que explicam a heterose: a sobredominância, quando o heterozigoto por si só explica esse fenômeno; e a dominância, que sugere que a maioria dos homozigotos endogâmicos expressa simplesmente uma alta proporção de alelos recessivos deletérios (Griffin, 1990), sendo por isso eliminados.

Na floresta tropical, a proporção de espécies arbóreas dióicas, auto-incompatíveis ou hermafroditas é bastante elevada, o que dá uma idéia de que árvores tropicais são predominantemente de fecundação cruzada (Bawa, 1974, 1979; Bawa & Hadley, 1990). Para muitas espécies arbóreas tropicais, as estimativas da quantidade de cruzamento têm revelado altas taxas de cruzamento (Boshier et al., 1995; Eguiarte et al., 1992; O'Malley & Bawa, 1987; O'Malley et al., 1988), porém gêneros amplos mostram certa variação nas taxas de cruzamento de suas espécies (Moran et al., 1989). O gênero *Piper* é um dos que apresentam grande número de espécies (Gentry, 1982), possuindo espécies autógamas (*P. nigrum* – Martin & Gregory, 1962), mistas (*P. amalago* – Heywood e Fleming, 1986) e alógamas (*P. cernuum* – Mariot, 2000).

Em algumas espécies pioneiras foram encontrados baixos níveis de cruzamento, sugerindo que no início da sucessão os colonizadores apresentam sistemas de acasalamento altamente plásticos, sustentando a idéia da produção de sementes por um único indivíduo que coloniza uma clareira (Hamrick, 1994a). Murawski et al. (1994), avaliando os efeitos do corte seletivo sobre a endogamia em *Shorea megistophylla*, verificaram que a taxa de cruzamento pode ser fortemente influenciada por fatores não-genéticos, pois a redução na densidade populacional devido à exploração foi associada com uma proporção significativamente maior de sementes produzidas por autofecundação. Outro estudo também indicou que espécies de menor densidade

populacional (raras) têm menores valores de t_m do que aquelas mais abundantes (Murawski & Hamrick, 1991).

As conseqüências da endogamia em espécies florestais tropicais não são bem conhecidas, porém existem alguns dados de perda de vigor, evidenciado em altura e produção de folhas (Moffett & Nixon, 1974). Evidências de depressão por endogamia foram observadas em *Acacia mangium* e em *Hevea brasiliensis* (Griffin, 1990).

A interação de forças genéticas, principalmente migração e seleção, afeta a distribuição da variação genética dentro de populações (Boyle et al., 1990). Diferenças significativas entre freqüências alélicas de subpopulações de *Pinus ponderosa*, separadas por distâncias menores que 100 m, em um ambiente heterogêneo, foram observadas por Linhart et al. (1981). A heterogeneidade de ambientes pode afetar a distribuição da variabilidade genética dentro de uma população ou mesmo entre populações de uma mesma espécie. Nestes casos, diz-se que a variabilidade genética é estruturada no espaço, podendo ocorrer uma diferenciação genética a distâncias relativamente pequenas (Linhart et al., 1981; Knowles, 1984).

Vários são os métodos utilizados para detectar a distribuição espacial da variação genética em populações. Em uma população claramente fragmentada ou em populações contínuas onde se observam unidades fisionômicas, a distribuição da variação genética pode ser estudada entre os grupos existentes (Linhart et al., 1981). A análise da autocorrelação espacial (Sokal & Oden, 1978) é uma metodologia que permite a avaliação de padrões da variação genética em diversas escalas espaciais, podendo, inclusive, determinar as causas evolucionárias do padrão espacial detectado (Slatkin & Arter, 1991; Epperson, 1990).

Estudos sobre a autocorrelação espacial em espécies arbóreas indicam tanto a completa ausência de estruturação (Epperson & Allard, 1989; Knowles, 1991; Gandara, 1996) como uma estrutura genética significativa em pequena escala conforme detectado em *Acer saccharum* (Perry & Knowles, 1990) e em *Pinus banksiana* e *Pinus contorta* (Wagner et al., 1991).

3.7 - Marcadores moleculares

Até a década de 80, estudos sobre estrutura genética de populações eram conduzidos utilizando-se apenas marcadores isoenzimáticos. Atualmente, os marcadores mais utilizados em genética têm sido os de DNA. No entanto, em estudos com populações naturais, os marcadores isoenzimáticos ainda são utilizados, mesmo com a disponibilidade de técnicas mais modernas. Porém, quando se avalia espécies com pouco polimorfismo ou quando é necessária uma cobertura ampla do genoma, estes marcadores apresentam limitações, sendo mais indicado o uso de marcadores de DNA.

Os marcadores de DNA mais utilizados em estudos genéticos de plantas são: *Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD (Ferguson et al., 1998; Sawazaki et al., 1997; Penteadó et al., 1996), *Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP (Demissie, 1996) e microssatélites - SSR (Sefc et al., 1998). Sob o ponto de vista genético, as técnicas de RFLP e SSR são superiores ao RAPD. Contudo, marcadores RAPD são os mais frequentemente utilizados por serem de fácil implementação, bastante polimórficos e de rápida execução, possibilitando resultados de grande validade prática. A técnica de RAPD (Williams et al., 1990) utiliza-se de uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a qual se baseia no anelamento e extensão de um par de iniciadores (*primers*) que são pequenas moléculas de DNA de fita simples, que delimitam a seqüência-alvo da molécula de DNA (Welsh & McClelland, 1990). A amplificação do fragmento de DNA é feita de modo exponencial e, devido à grande quantidade produzida, o fragmento de DNA pode ser visualizado a olho nu, por meio de corante específico (brometo de etídio), como uma banda em gel de agarose.

O polimorfismo de RAPD gerado em função da homologia do iniciador com a seqüência de DNA genômico (geralmente dez nucleotídeos) é sensível a pequenas mudanças nas seqüências do sítio de iniciação. Williams et al. (1990), trabalhando com fragmentos amplificados como sonda em ensaio de RFLP, verificaram que, das onze sondas amplificadas, seis hibridizaram com DNA de cópia única, três hibridizaram com DNA medianamente repetitivo e duas hibridizaram com DNA altamente repetitivo, o que os levou a concluir que os marcadores RAPD detectam uma grande quantidade de

polimorfismo distribuída por todo o genoma, amostrando inclusive regiões de DNA repetitivo. Portanto, a técnica de RAPD é eficiente nos estudos de divergência genética em que os indivíduos analisados são geneticamente próximos, ou seja, pertencem a uma mesma espécie (Haley et al. 1994).

A principal desvantagem dos marcadores RAPD é sua herança dominante, ou seja, não se pode determinar se uma banda de um gel de RAPD é produto da amplificação de um ou dois fragmentos de DNA (no caso de diplóides) e, assim, indivíduos homozigotos dominantes não podem ser diferenciados dos heterozigotos (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). Recentemente, marcadores RAPD têm sido utilizados, com sucesso, para estimativas de taxa de cruzamento de espécies alógamas (Gaiotto et al., 1997), utilizando-se um grande número de marcadores nas progênes para contornar o problema da dominância (Ritland & Jain, 1981).

Em programas de melhoramento genético, a caracterização da diversidade genética por meio de marcadores moleculares, seja de coleções de trabalho ou de populações naturais, é um método rápido e eficiente para selecionar os parentais que constituirão as populações de melhoramento. Estas populações são formadas cruzando-se plantas superiores e divergentes, buscando maximizar as distâncias genéticas a fim de se recombinar genes co-adaptados. Com o uso de marcadores moleculares, pode-se gerar uma grande quantidade de informações que, associada a características fenotípicas, permitem o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos de forma rápida e muito eficiente (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em três etapas: a) avaliação da estrutura genética de populações naturais de *P. hispidinervum*, no Vale do Acre; b) estimativa da taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia em uma população natural de *P. hispidinervum*; e c) avaliação da diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre.

A metodologia utilizada neste trabalho consistiu na análise de marcadores de DNA amplificados ao acaso (RAPD), a partir dos quais fizeram-se todas as inferências e estimativas. Todas as análises de laboratório foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, em Piracicaba (SP).

4.1 - *Extração de DNA*

O procedimento para extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996), com algumas modificações no tampão de extração, o qual foi composto por 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 20 mM de EDTA pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 2% de CTAB; 1% de Sarkozyl; e 0,1% de 2-Mercaptoetanol. A concentração de DNA extraído foi estimada pela comparação das amostras com quantidades conhecidas de DNA de fago λ , corados por brometo de etídio em gel de agarose 1% após eletroforese em tampão TBE 0,5X. Após estimativa das concentrações de DNA, as amostras foram diluídas para 4 ng/ μ l e requantificadas para verificação da diluição.

4.2 - Seleção de Primers e reação RAPD

A seleção de *primers* foi feita a cada etapa do trabalho em função de suas particularidades. *Primers* das séries A, B, C, D, AA e AB da Operon Technologies foram avaliados, utilizando-se sempre quatro indivíduos com características distintas, amostrados para o respectivo estudo. Nesta seleção, procurou-se selecionar *primers* que amplificaram o maior número de marcadores polimórficos e de boa qualidade para leitura.

Para análise da estrutura genética de populações naturais de pimenta longa, foram avaliados 80 *primers*, sendo escolhido oito para as análises. No estudo para estimativa da taxa de cruzamento, procurou-se utilizar os oito *primers* já selecionados, porém apenas quatro desses se mostraram polimórficos e adequados para este estudo, sendo selecionados outros quatro para as análises.

A seleção de *primers* para estimativas das taxas de cruzamento, via marcadores dominantes, tem um caráter um pouco diferente dos demais, pois, neste caso, locos informativos são aqueles em que a maioria das plantas-mãe apresenta ausência de bandas (-/-), indicando que a mãe é recessiva, e a presença de banda nos filhos significa que estes são heterozigotos (+/-) para este loco, evidenciando que houve cruzamento. Segundo Ritland & Jain (1981), a frequência esperada de filhos heterozigotos, oriundos de uma mãe homozigota, é dada por tp , onde t é a taxa de cruzamento e p a frequência do alelo dominante (+) no *pool* de pólen da população.

Para a avaliação da diversidade genética das espécies de pimenta longa mantidas na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, foram selecionados 16 *primers* das séries A, B e C.

O protocolo utilizado para amplificação de seqüências de DNA, via PCR (Reação de Polimerização em Cadeia), foi o proposto por Williams et al. (1990). As reações de amplificação foram feitas em dois tipos de termociclador, um MJ Research Inc., modelo PTC-100TM, e um da marca Techne, modelo Genius, utilizados para as análises de estrutura genética de populações naturais e estimativas da taxa de cruzamento; e diversidade genética da Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa, respectivamente.

O volume final para cada reação de PCR foi de 13 µl contendo 1X de tampão PCR; 200 µM de cada dNTP; 10 mg/ml de BSA; 0,2 µM de *primer*; 1 un. de taq; e 12 ng de DNA. O programa para amplificação consistiu em 1 ciclo de 1 minuto a 95°C; 40 ciclos de: 1 minuto a 92°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 35°C para anelamento dos *primers*, e 2 minutos a 72°C para extensão da fita de DNA complementar; e, para terminar, 7 minutos a 72°C para extensão dos produtos amplificados.

Após amplificação, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, submerso em tampão TBE 0,5X por cerca de 4 horas sob voltagem constante de 120V e observados, na forma de bandas, sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. Cada gel foi fotodocumentado por sistema eletrônico de captura de imagem da Kodak (KDS 1D 2.0). Bandas com mesma mobilidade e peso molecular foram consideradas como fragmentos idênticos. Para a leitura e comparação de diferentes géis, foi utilizado um marcador de tamanho de fragmentos de DNA de 1 Kb (1Kb *ladder* da GIBCO).

4.3 - Leitura dos dados moleculares

Para análise dos dados, cada fragmento amplificado foi considerado como um loco RAPD, sendo denominado pelo *primer* utilizado seguido de uma letra correspondente ao peso molecular do fragmento, de modo que o maior fragmento recebeu a letra a, o subsequente a letra b e assim por diante. Locos RAPD consistentes foram analisados para presença (1) ou ausência (0) de bandas e uma matriz com os diferentes fenótipos RAPD foi montada para cada etapa. Como os marcadores RAPD são de natureza dominante, assumiu-se a presença de dois alelos por loco.

4.4 - Estrutura genética de populações naturais de *P. hispidinervum* no Vale do Acre

4.4.1 - Material de estudo

No período de maio a julho de 1999, foram realizadas algumas expedições ao campo, em que todos os municípios do Vale do Acre foram visitados para identificação

de populações naturais de pimenta longa (Figura 01) e coleta de material vegetal para extração de DNA. Em cada município foram amostradas uma ou mais populações (Tabela 01), exceto no município de Rio Branco em que não houve coleta. No município de Porto Acre foi amostrada uma população, porém os dados de marcadores RAPD revelaram que as plantas coletadas não pertenciam à espécie *P. hispidinervum* e sim à *P. aduncum*, sendo por isso descartada desse estudo.

Cada população amostrada foi georeferenciada por meio de GPS e localizada no mapa do estado do Acre (Figura 02). A amostragem dentro de cada população consistiu na escolha aleatória de 23 indivíduos, coletando-se de cada um quatro folhas jovens totalmente expandidas. O material vegetal coletado foi identificado e colocado para secar em sílica gel para posterior análise dos marcadores RAPD.



a)



b)

Figura 01 - Visão geral de duas populações naturais de pimenta longa (*P. hispidinervum*) no município de Brasília. a) Ramal 13; b) Ramal 17.

Tabela 01. Identificação e localização das populações naturais de *P. hispidinervum* avaliadas no Vale do Acre.

| Pop | Código | Município | Localização (UTM) | | |
|-----|--------|----------------|-------------------|--------|---------|
| 1 | Acrel | Acrelândia | 19L | 711287 | 8884113 |
| 2 | Assis | Assis Brasil | 19L | 442555 | 8794784 |
| 3 | Bra13 | Brasiléia R.13 | 19L | 520858 | 8802965 |
| 4 | Bra17 | Brasiléia R.17 | 19L | 510416 | 8786819 |
| 5 | Bra54 | Brasiléia R.54 | 19L | 497193 | 8805734 |
| 6 | Bra78 | Brasiléia R.78 | 19L | 465092 | 8805241 |
| 7 | Bujari | Bujari | 19L | 607513 | 8908317 |
| 8 | Capalc | Capixaba | 19L | 639885 | 8847396 |
| 9 | Capbol | Capixaba | 19L | 644340 | 8825577 |
| 10 | Plac | Plácido | 19L | 690596 | 8859420 |
| 11 | Seng | Sen Guiomard | 19L | 648111 | 8875996 |
| 12 | Xapar | Xapuri | 19L | 610795 | 8829813 |
| 13 | Xapmar | Xapuri | 19L | 560785 | 8813626 |

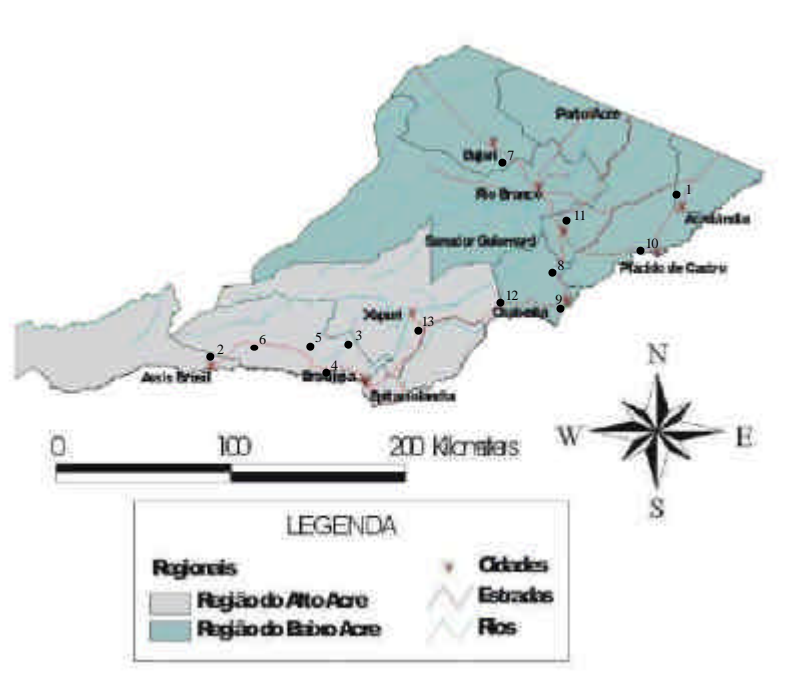


Figura 02 - Mapa do Vale do Rio Acre (estado do Acre), identificando a localização das populações naturais de pimenta longa estudadas.

4.4.2 - *Leitura e análise dos dados*

Marcadores consistentes para todas as populações foram avaliados pela presença (1) e ausência (0) de bandas, obtendo-se uma matriz de fenótipos RAPD. A análise de estrutura genética com dados de marcadores RAPD é prejudicada pela falta de informação dos genótipos avaliados, por se tratar de um marcador dominante. Com o objetivo de minimizar o viés nas estimativas dos parâmetros genéticos o critério de Lynch & Milligan, 1994 foi adotado para as análises estatísticas, em que apenas marcadores com frequência superior a $1 - \frac{3}{N}$ foram considerados, sendo N o número total de indivíduos analisados.

O número total de marcadores lidos originalmente foi 56, dos quais 12 apresentaram frequência maior que 98,99%, sendo descartados para as análises da variância molecular (AMOVA); fluxo gênico; frequências alélicas das populações, estimadas pelo método de Lynch & Milligan (1994); e das estimativas de theta, assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas populações. Os 56 marcadores lidos originalmente foram utilizados para cálculos da porcentagem de polimorfismo total (critério 100% e 99%) e para cada população; e do número de alelos privados em cada população e região, considerando-se apenas o alelo responsável pela presença da banda. Esse critério foi adotado pelo fato de não se ter certeza que a ausência de um marcador, em determinado grupo, que foi monomórfico para os demais signifique a ocorrência do alelo recessivo para aquele loco.

O programa computacional WINAMOVA versão 1.55, desenvolvido por Excoffier et al. (1992) para análise da variância molecular de haplótipos, foi utilizado para estimativa da distribuição da variabilidade genética em uma estrutura hierárquica de populações e regiões; e das distâncias genéticas entre pares de populações, calculadas pela matriz de distância Euclidiana (Excoffier et al., 1992). Embora esse programa não tenha sido desenvolvido para uso com dados de RAPD, alguns estudos sobre a estrutura genética de populações com dados RAPD têm utilizado o WINAMOVA com sucesso

³ Critério 100%: apenas marcadores presentes em 100% dos indivíduos são considerados monomórficos. Critério 99%: marcadores que aparecem em 99% dos indivíduos são considerados monomórficos.

(Huff et al., 1993; Nebauer et al., 1999; Kirsten et al., 1998; Jäggi et al., 2000). O número de indivíduos amostrados e analisados em cada população, para este estudo, foi de 23; no entanto, somente 19 indivíduos por população puderam ser analisados no programa WINAMOVA, pelo fato deste não aceitar mais que 255 indivíduos.

A AMOVA é uma análise hierárquica da variância utilizada para analisar e testar partes da diversidade genética total como a diversidade existente entre grupos de populações; entre populações dentro de grupos; e entre indivíduos dentro de população. Por se tratar de variação molecular de marcadores dominantes, todas análises são feitas entre haplótipos pelo fato da variação dentro de indivíduos não ser acessada.

O modelo ao qual a estrutura de populações é avaliada se refere a um modelo hierárquico, onde os efeitos são considerados aditivos, aleatórios e não-correlacionados. O quadro da análise de variância é demonstrado na tabela 02

Tabela 02. Quadro da análise de variância molecular.

| Fonte de Variação | GL | QM | Esperança do QM |
|--|------------------------|---------------|------------------------------|
| Entre regiões | $R - 1$ | $QM_{(ER)}$ | $s_c^2 + n's_b^2 + n''s_a^2$ |
| Entre populações, dentro de regiões | $\sum_{g=1}^R I_g - R$ | $QM_{(EP/R)}$ | $s_c^2 + n s_b^2$ |
| Entre indivíduos, dentro de populações | $N - \sum_{g=1}^R I_g$ | $QM_{(DP)}$ | s_c^2 |
| Total | $N - 1$ | | |

Os componentes da variância são utilizados para estimar a variabilidade genética por meio das estatísticas- \mathbf{f} , as quais são similares às estatísticas- F de Wrigth. Assim como as estatísticas- F , as estatísticas- \mathbf{f} contém três componentes referentes à distribuição hierárquica da variação genética.

\mathbf{f}_{RT} estima a parte da variação genética total que é dada pela diferença entre regiões, ou seja, informa qual é a variabilidade genética que existe entre regiões.

$$f_{RT} = \frac{s_a^2}{s_a^2 + s_b^2 + s_c^2}$$

f_{SR} é o componente que estima a variabilidade genética entre populações, dentro de regiões. Nesse caso a variância entre regiões não é computada pelo fato da análise ser feita dentro de cada região separadamente.

$$f_{SR} = \frac{s_b^2}{s_b^2 + s_c^2}$$

f_{ST} estima a variabilidade genética que existe entre populações, considerando o conjunto como um todo.

$$f_{ST} = \frac{s_a^2 + s_b^2}{s_a^2 + s_b^2 + s_c^2}$$

A significância da distribuição da variância da diversidade molecular foi determinada pela comparação dos resultados das estatísticas- f com a variância estimada por meio de 1.000 permutações aleatórias.

Como o programa WINAMOVA permite dividir a variância em três componentes hierárquicos, foram feitas análises para avaliar a partição da variância genética entre e dentro de populações como um todo e entre e dentro de duas regiões do Vale do Acre (Baixo e Alto Acre).

A distância genética entre populações foi estimada calculando-se a estimativa de f_{ST} entre cada par de população. Por esse procedimento, o valor médio das distâncias entre os pares de populações deve ser igual ao valor encontrado para a estatística f_{ST} . As distâncias genéticas, assim calculadas, foram utilizadas para o agrupamento das populações, utilizando-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetical Means*) (NTSYS-pc versão 1.70), o qual foi evidenciado na forma de dendrograma. A consistência do dendrograma foi avaliada pela correlação cofenética entre as distâncias geradas pelo dendrograma e as distâncias genéticas entre pares de populações. A significância dessa correlação foi testada pelo teste de Mantel, fazendo-se 1000 permutações aleatórias. O teste de Mantel foi feito utilizando-se a programa computacional NTSYS-pc versão 1.70.

Com base nos resultados obtidos com as progênies da população natural de Assis Brasil (item 5.2), em que foram constatadas alogamia da espécie e aderência das frequências gênicas da população ao equilíbrio de Hardy-Weimberg, assumiu-se que todas as demais populações encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Assim, para confirmar os resultados obtidos pela AMOVA, os dados de marcadores RAPD (44 polimórficos) foram utilizados no programa computacional TFPGA (*Tools for Population Genetic Analyses*) para estimar a frequência alélica de cada população; a porcentagem de locos polimórficos por população; e as estimativas de theta, pelo método de Weir & Cockerham (1984), as quais correspondem à estatística- F_{ST} de Wright (1931), onde Φ refere-se à diferenciação genética entre grupos e ϕ à diferenciação entre populações.

Como os dados são de marcadores dominantes, a presença do marcador em determinado loco implicou em um genótipo dominante, enquanto que a ausência do mesmo em outro indivíduo representou o genótipo recessivo homozigoto, assumindo-se, portanto, a ocorrência de apenas dois alelos por loco. A fim de se diminuir o viés nas estimativas das frequências alélicas, estas foram estimadas segundo a metodologia descrita por Lynch & Milligan (1994), baseada na Expansão de Taylor.

As frequências alélicas estimadas para cada população foram utilizadas para obtenção de uma matriz de distâncias genéticas de Nei (1972) entre pares de populações e agrupamento das mesmas pelo método UPGMA. O agrupamento gerado foi visualizado por meio de dendrograma, o qual teve sua consistência testada da mesma forma que o dendrograma gerado pelas distâncias genéticas entre populações em função da estatística f_{ST} . A correlação entre as duas matrizes de distâncias genéticas foi avaliada pelo teste de Mantel, a fim de se verificar a significância da correlação. Esta análise permitiu avaliar a consistência das estimativas dadas pelas estatísticas- f , além de inferir sobre a panmixia da espécie.

Para avaliação do efeito do fluxo gênico na diferenciação genética das populações em função da distribuição espacial das mesmas, foi feito um gráfico, em planilha Excel, da correlação entre a distância genética, em função de f_{ST} , e a distância geográfica (Km)

entre cada par de população. A correlação entre estas distâncias foi avaliada pelo teste de Mantel.

Estimativas do fluxo gênico foram feitas pelo método indireto proposto por Wright (1951), em que o fluxo gênico aparente é estimado a partir da diferenciação genética entre populações. A expressão utilizada para o cálculo do fluxo gênico aparente, segundo Wright (1951), assume o modelo de ilhas e é dada por:

$$\hat{N}_e m = \frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}}$$

onde,

N_e é o tamanho efetivo de indivíduos na população (será usada a notação N para maior facilidade); e

m é a taxa de migração.

As estimativas de $\hat{N}_e m$ foram obtidas com as estimativas- f utilizando-se f_{ST} , f_{RT} e f_{SR} para se estimar o fluxo gênico aparente entre populações, entre regiões e entre populações dentro de regiões, respectivamente.

O modelo de ilhas assume algumas pressuposições para a validade da expressão acima, as quais são: as populações são constituídas por indivíduos diplóides, pertencentes a gerações não sobrepostas e os cruzamentos são aleatórios.

4.5 - Estimativa da taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia de uma população natural de *P. hispidinervum*

4.5.1 - Material de estudo

Nesta etapa foram utilizadas 25 famílias de pimenta longa, amostradas ao acaso em uma população natural de Assis Brasil, localizada no Km 7 da rodovia BR 317, sentido Assis Brasil – Brasília. O material vegetal utilizado para análise das plantas-mãe foi coletado na população natural, o qual consistiu em folhas jovens totalmente expandidas. Após a coleta, as folhas foram colocadas para secar em sílica gel e enviadas

para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), da ESALQ/USP, em Piracicaba (SP), onde foram feitas as análises de marcadores RAPD.

De cada indivíduo amostrado foram coletadas sementes, as quais foram beneficiadas e plantadas em viveiro na área experimental de Horticultura da Embrapa Acre, formando-se cerca de 30 mudas de cada matriz para constituir uma progênie (Figura 03). O material vegetal para análise molecular das progênies foi coletado de 15 indivíduos de cada família, após três meses do plantio das mudas em experimento de teste de progênies (blocos casualizados com três repetições). Cada amostra foliar foi identificada, seca em sílica gel e enviada para análise no LARGEA.



Figura 03 - Viveiro de mudas de pimenta longa, formadas para estimativa da taxa de cruzamento, destacando as mudas formadas para obtenção das progênies oriundas das plantas-mãe 1, 2, 3 e 4 amostradas na população natural de Assis Brasil.

4.5.2 - Análise de dados

Os fenótipos RAPD das 25 progênies e genótipos estimados para as plantas-mãe foram analisados no programa Multilocus Estimation of Outcrossing with Dominant Markers (MLDT), desenvolvido por Ritland (1990). Este programa nos permitiu estimar a taxa de fecundação cruzada da população com base em múltiplos locos (tm); a média da taxa de fecundação cruzada da população, considerando os locos individuais (ts); as frequências alélicas da população (pi); o coeficiente de endogamia da geração parental (F); a taxa de cruzamento preferencial entre indivíduos aparentados ($tm - ts$); e a taxa de cruzamento para cada família, fixando a frequência alélica estimada para a população. Os genótipos maternos foram estimados pela leitura dos fenótipos moleculares, em função dos marcadores presentes na progênie; estes foram informados ao programa no arquivo de dados.

Cada loco foi testado separadamente quanto à aderência ao modelo misto de reprodução, por meio do teste de qui-quadrado. Os locos em que o valor do qui-quadrado foi maior que 3,841 foram descartados da análise por não aderirem ao modelo.

As estimativas das taxas de cruzamento e do coeficiente de endogamia foram calculadas pelo método de Newton-Raphson por fornecer estimativas válidas maiores do que 1,00; já as frequências gênicas foram estimadas pelo método *Expectation-Maximization*. A variância dos parâmetros avaliados foi estimada por 1.000 reamostragens (*bootstraps*) feitas dentro de famílias.

O coeficiente de endogamia da geração parental (F) foi comparado com o coeficiente de endogamia aparente das progênies (F_{ap}) para uma verificação do equilíbrio de endogamia (Wright) da população, o qual foi calculado pela seguinte expressão:

$$F_{ap} = \frac{1 - t_m}{1 + t_m}$$

Os genótipos maternos foram utilizados no programa GDA (*Genetic Data Analysis*) a fim de se estimar o coeficiente de endogamia f , que corresponde à endogamia devido ao modo de reprodução (F_{IS}). A significância dessa estimativa foi estimada por 1.000 reamostragens dos locos e intervalo de confiança de 95%.

4.6 - Diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre

4.6.1 - Material de estudo

O material vegetal utilizado neste estudo foi coletado na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, localizada no Campo Experimental da Embrapa Acre, Km 14 da Rodovia BR-364, Rio Branco (AC). Esta coleção contém clones das três espécies de pimenta longa, coletados no estado do Acre (Oliveira & Lunz, 1996), sendo variável o número de clones por genótipo.

Na época da coleta do material haviam 49 genótipos de pimenta longa, procedentes de treze municípios do estado do Acre (Figura 04), representados por 230 indivíduos, distribuídos em três espécies: *P. hispidinervum*, *P. aduncum*, e *P. hispidum*.

A amostragem para este estudo foi feita em maio de 1999 e consistiu na coleta de quatro folhas jovens, totalmente expandidas, de um indivíduo de cada genótipo. O material coletado foi identificado e colocado para secar em sílica gel para posterior extração de DNA e análise dos marcadores RAPD. Cada genótipo foi identificado por um código, correspondente à denominação dada na coleção de germoplasma, sendo determinado sua procedência, espécie e caracterização quanto aos rendimentos de óleo e teor de safrol no óleo extraído (Tabela 03).

A análise química dos genótipos foi feita pela amostragem de folhas e ramos finos, os quais foram secos em ambiente ventilado por sete dias. A obtenção do óleo se deu por hidrodestilação do material seco durante cerca de uma hora, com posterior centrifugação da amostra para separação do óleo da fase aquosa. O rendimento de óleo foi calculado em base livre de umidade (B.L.U.), segundo a expressão:

$$\text{Re ndB.L.U.} = \frac{\% \text{ Re nd.100}}{100 - \%U}$$

onde,

%Rend é o rendimento de óleo dado por: $\frac{\text{vol\acute{o}leo(ml)}.100}{25}$;

%U é a porcentagem de umidade da amostra dada por:
 $\frac{(\text{peso\acute{u}mido} - \text{peso seco}).100}{5}$

O teor de safrol no óleo foi obtido por análise de cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo de gás modelo HP 5980^A, com uma coluna de sílica fundida de 30 m (DB-5). As análises de teor de safrol no óleo foram conduzidas no Museu Paraense Emílio Goeldi-PA.



Figura 04: Mapa Administrativo do estado do Acre indicando os pontos de coleta de germoplasma de pimenta longa (foto cedida pelo governo do estado do Acre).

Tabela 03. Identificação dos genótipos de pimenta longa avaliados na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, indicando a espécie, procedência, rendimento de óleo e teor de safrol no óleo de cada genótipo.

| Cod. | Genótipo | Espécie | Procedência (município) | Óleo ¹ (%) | Safrol (%) |
|------|----------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------|
| 1 | B 014 | não identificado | Plác. de Castro | 3,59 | 91,87 |
| 2 | B 015 | <i>P. hispidinervum</i> | Plác. de Castro | 2,88 | 95,09 |
| 3 | B 016 | <i>P. hispidinervum</i> | Plác. de Castro | 3,05 | 96,30 |
| 4 | B 017 | <i>P. hispidinervum</i> | Plác. de Castro | 3,15 | 95,04 |
| 5 | B 018 | <i>P. hispidinervum</i> | Plác. de Castro | 3,02 | 95,16 |
| 6 | B 019 | <i>P. hispidinervum</i> | Plác. de Castro | 2,92 | 95,79 |
| 7 | B 034 | <i>P. hispidinervum</i> | Acrelândia | 2,04 | 91,46 |
| 8 | B 040 | <i>P. hispidinervum</i> | Sen. Guiomard | 2,54 | 90,56 |
| 9 | B 042 | <i>P. hispidinervum</i> | Sen. Guiomard | 2,07 | 93,87 |
| 10 | B 043 | <i>P. hispidinervum</i> | Sen. Guiomard | 2,37 | 94,02 |
| 11 | B 044 | <i>P. hispidinervum</i> | Sen. Guiomard | 2,46 | 96,47 |
| 12 | B 045 | <i>P. hispidinervum</i> | Sen. Guiomard | 2,07 | 92,58 |
| 13 | B 046 | <i>P. hispidinervum</i> | Sen. Guiomard | 2,07 | 90,39 |
| 14 | B 047 | não identificado | Porto Acre | | |
| 15 | B 050 | <i>P. hispidinervum</i> | Porto Acre | 2,61 | 94,31 |
| 16 | B 051 | <i>P. hispidinervum</i> | Porto Acre | 2,00 | 93,59 |
| 17 | B 052 | <i>P. hispidinervum</i> | Bujari | 3,54 | 92,87 |
| 18 | B 053 | não identificado | Bujari | 3,57 | |
| 19 | B 067 | <i>P. hispidinervum</i> | Brasiléia | 2,81 | 91,18 |
| 20 | B 075 | não identificado | Brasiléia | 5,27 | 94,63 |
| 21 | B 080 | não identificado | Assis Brasil | 5,05 | |
| 22 | B 084 | não identificado | Sen. Guiomard | 4,58 | 94,01 |
| 23 | B 086 | não identificado | Sen. Guiomard | 4,00 | 95,06 |
| 24 | B 090 | <i>P. hispidinervum</i> | Assis Brasil | 3,37 | 96,02 |
| 25 | B 100 | <i>P. hispidinervum</i> | Bujari | 3,41 | 96,50 |
| 26 | B 103 | <i>P. hispidinervum</i> | Bujari | 3,48 | 96,97 |
| 27 | B 109 | <i>P. aduncum</i> | Cruzeiro do Sul | 3,67 | Traços |
| 28 | B 110 | <i>P. aduncum</i> | Cruzeiro do Sul | 3,59 | 0,17 |
| 29 | B 111 | <i>P. aduncum</i> | Cruzeiro do Sul | 3,55 | 0,10 |
| 30 | B 112 | <i>P. aduncum</i> | Cruzeiro do Sul | 2,82 | 3,24 |
| 31 | B 113 | <i>P. aduncum</i> | Cruzeiro do Sul | 5,68 | 1,03 |
| 32 | B 114 | <i>P. aduncum</i> | Cruzeiro do Sul | 3,95 | Traços |
| 33 | B 115 | <i>P. aduncum</i> | Mâncio Lima | 4,39 | Traços |
| 34 | B 116 | <i>P. aduncum</i> | Mâncio Lima | 4,85 | Traços |
| 35 | B 117 | <i>P. aduncum</i> | Rodrigo Alves | 4,83 | Traços |
| 36 | B 118 | <i>P. aduncum</i> | Rodrigo Alves | 3,57 | Traços |
| 37 | B 119 | <i>P. aduncum</i> | Rodrigo Alves | 3,68 | Traços |
| 38 | B 120 | <i>P. aduncum</i> | Rodrigo Alves | 3,58 | 0,15 |
| 39 | B 121 | <i>P. aduncum</i> | Rodrigo Alves | 4,32 | 0,08 |
| 40 | B 127 | <i>P. hispidum</i> | Feijó | 1,33 | 0,14 |
| 41 | B 137 | não identificado | Tarauacá | 4,49 | 15,33 |
| 42 | B 138 | não identificado | Tarauacá | 3,99 | 40,87 |

continua

Tabela 03. Identificação dos genótipos de pimenta longa avaliados na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, indicando a espécie, procedência, rendimento de óleo e teor de safrol no óleo de cada genótipo (continuação).

| Cod. | Genótipo | Espécie | Procedência (município) | Óleo ¹ (%) | Safrol (%) |
|------|----------|------------------|-------------------------|-----------------------|------------|
| 43 | B 139 | não identificado | Tarauacá | 4,04 | 18,43 |
| 44 | B 141 | não identificado | Tarauacá | 3,47 | 4,64 |
| 45 | B 142 | não identificado | Tarauacá | 4,94 | 28,14 |
| 46 | B 144 | não identificado | Tarauacá | 3,87 | 24,65 |
| 47 | B 145 | não identificado | Bujari | 4,37 | 92,44 |
| 48 | B 147 | não identificado | Xapuri | 5,37 | 87,26 |
| 49 | B 148 | não identificado | Xapuri | 1,66 | 0 |

¹ Rendimento em base livre de umidade.

4.6.2 - Leitura e análise de dados

Marcadores consistentes foram lidos para todos os indivíduos analisados e a matriz contendo os fenótipos RAPD foi utilizada para cálculo dos valores de similaridade de Jaccard entre pares de genótipos de pimenta longa e construção da matriz de similaridade correspondente. A matriz obtida foi usada para gerar um dendrograma pelo método UPGMA. As distâncias geradas pelo dendrograma foram comparadas com as distâncias genéticas entre pares de genótipos para cálculo da correlação cofenética, a qual foi testada pelo teste de Mantel. Além da correlação cofenética, que dá uma idéia da consistência dos grupos formados na análise de agrupamento, a estabilidade de cada nó do dendrograma foi testada por análise de reamostragens, utilizando o programa Bood, desenvolvido por Coelho (2000).

4.6.3 - Identificação taxonômica baseada em dados de marcadores RAPD

Com base nos resultados da análise de agrupamento, os 49 genótipos foram classificados quanto à espécie botânica. Os genótipos em que a identificação taxonômica, baseada em marcadores RAPD, esteve de acordo com a classificação botânica foram utilizados para detectar marcadores diagnósticos para as espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, visto que este tipo de marcador requer identificação correta do acesso-tipo para cada espécie. A espécie *P. hispidum* não foi incluída nessa análise por existir apenas um genótipo na coleção. O critério para definição de um

marcador diagnóstico para determinada espécie foi sua ocorrência em pelo menos 90% de seus indivíduos e ausência completa nas demais espécies.

Genótipos não identificados taxonomicamente e que se agruparam com determinada espécie foram classificados como pertencentes a esta espécie, observando-se, ainda, a presença de marcadores diagnósticos. Nos casos em que houve dúvida, devido ao agrupamento, a caracterização quanto à espécie não pôde ser confirmada, embora a presença ou ausência de marcadores diagnósticos indicasse uma tendência. Para confirmação desses resultados, torna-se necessária a realização de estudos adicionais, aumentando-se o número de marcadores e lançando mão de outras tecnologias.

5. RESULTADOS

5.1 - Estrutura genética de populações naturais de *Piper hispidinervum* no Vale do Acre

Os oito *primers* utilizados neste estudo amplificaram 56 marcadores consistentes para análise. Desses 56 marcadores, 78,57% foram polimórficos para todas as populações, considerando o critério de 99% (Tabela 04). O número médio de marcadores RAPD amplificados por *primer* foi sete. A Figura 05 ilustra o padrão de bandas obtido pela análise RAPD de quatro populações com o *primer* OP-D11.

Tabela 04. *Primers* utilizados para análise da estrutura genética de populações naturais de pimenta longa, com suas seqüências de bases nucleotídicas e número de marcadores amplificados e polimórficos.

| Primer | Sequência 5'- 3' | Marcadores RAPD | | |
|---------------------|---------------------|-----------------|--------------|--------------|
| | | Total | Polimórficos | |
| | | | Crit. 100% | Crit. 99% |
| OP-A12 | TCGGCGATAG | 8 | 7 | 7 |
| OP-B08 | GTCCACACGG | 6 | 4 | 4 |
| OP-B11 | GTAGACCCGT | 10 | 10 | 9 |
| OP-C06 | GAACGGACTC | 4 | 3 | 3 |
| OP-D02 | GGACCCAACC | 7 | 6 | 5 |
| OP-D11 | AGCGCCATTG | 9 | 9 | 7 |
| OP-D12 | CACCGTATCC | 5 | 5 | 4 |
| OP-D20 | ACCCGGTCAC | 7 | 6 | 5 |
| TOTAL | | 56 | 50 | 44 |
| Média | | 7 | | |
| Polimorf (%) | | | 89,29 | 78,57 |

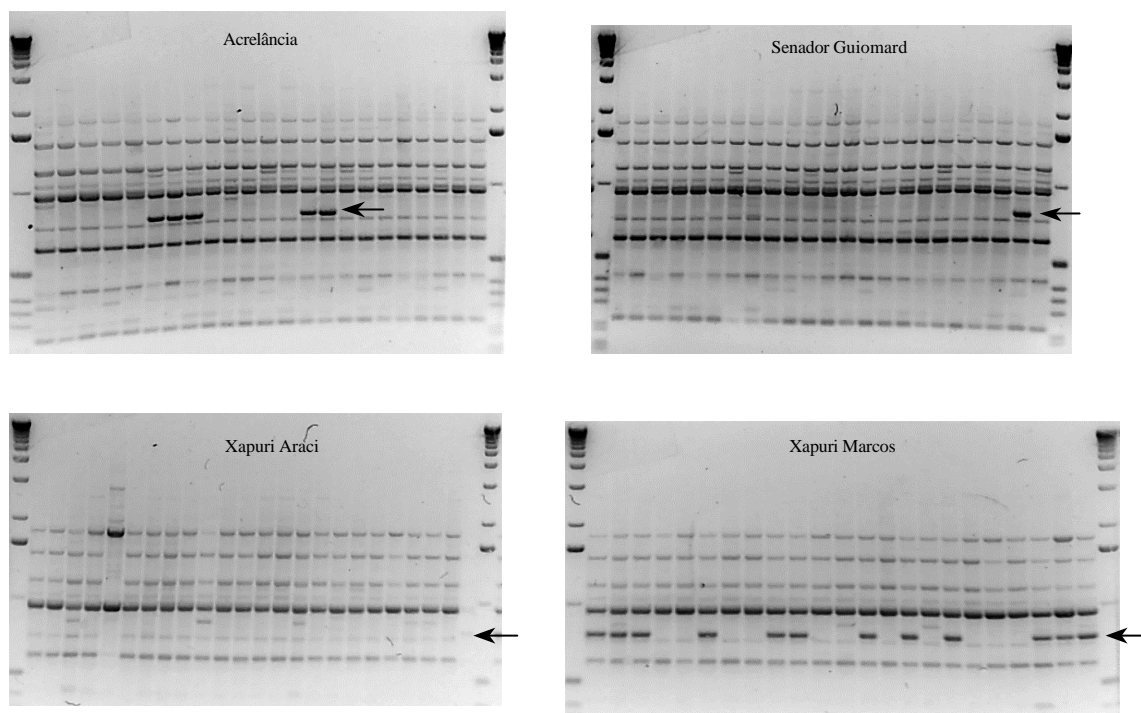


Figura 05 - Padrão de bandas (marcadores) amplificadas com o *primer* OP-D11 e indivíduos das populações naturais de pimenta longa de Acrelândia, Senador Guiomard, Xapuri Araci e Xapuri Marcos. As setas indicam um dos locos RAPD analisados.

A distribuição dos marcadores RAPD entre as populações foi praticamente constante e independente da localização geográfica (Figura 06). Poucos marcadores foram exclusivos a determinada população ou indivíduos. Os marcadores exclusivos de Plácido de Castro e Acrelândia foram genótipos-exclusivo também, ou seja, apareceu em apenas um indivíduo da população.

A porcentagem de marcadores polimórficos observados em cada população variou de 28,6 a 48,2%, sendo a população de Plácido de Castro a que apresentou maior polimorfismo e a do ramal 17 da BR 317, município de Brasília, a mais homogênea (Figuras 07 e 08).

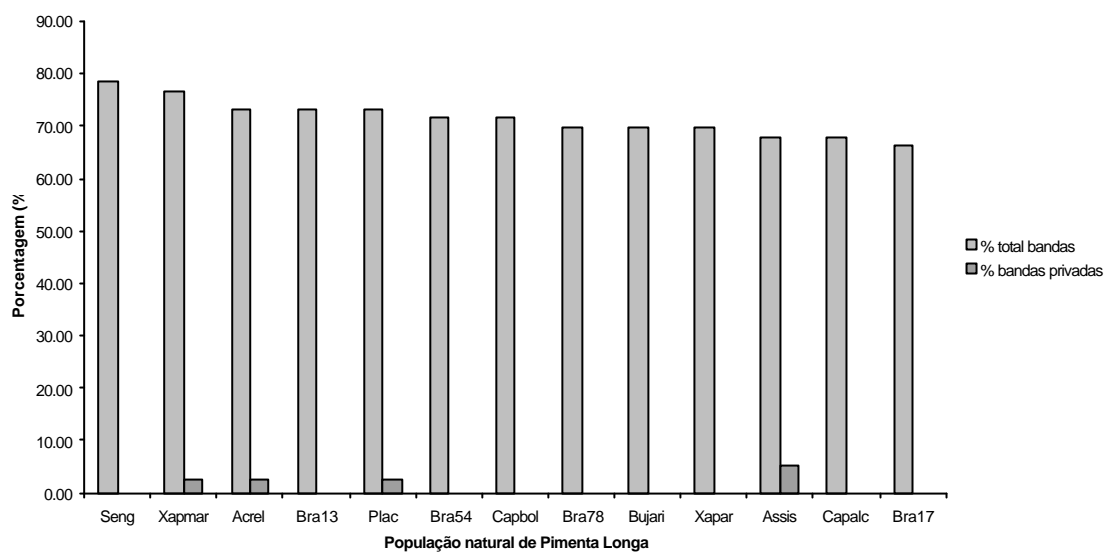


Figura 06 - Distribuição dos marcadores RAPD em cada população natural de pimenta longa avaliada, indicando a porcentagem de marcadores RAPD presente na população em relação ao total de marcadores avaliados e a porcentagem de marcadores exclusivos a cada população, em relação ao número total de marcadores presentes na população.

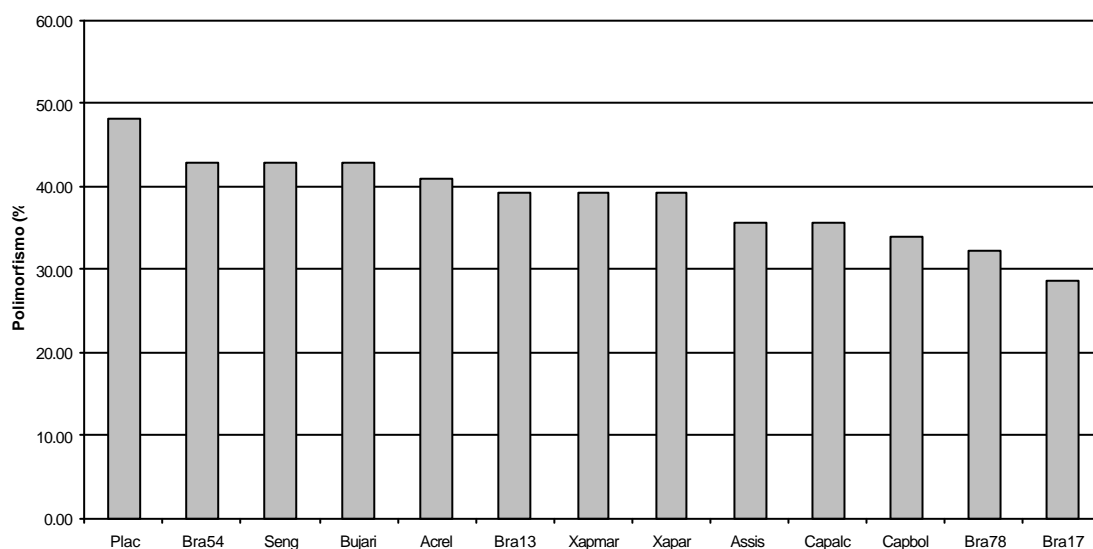


Figura 07 - Porcentagem de marcadores RAPD polimórficos em cada população natural de pimenta longa avaliada no Vale do Acre.

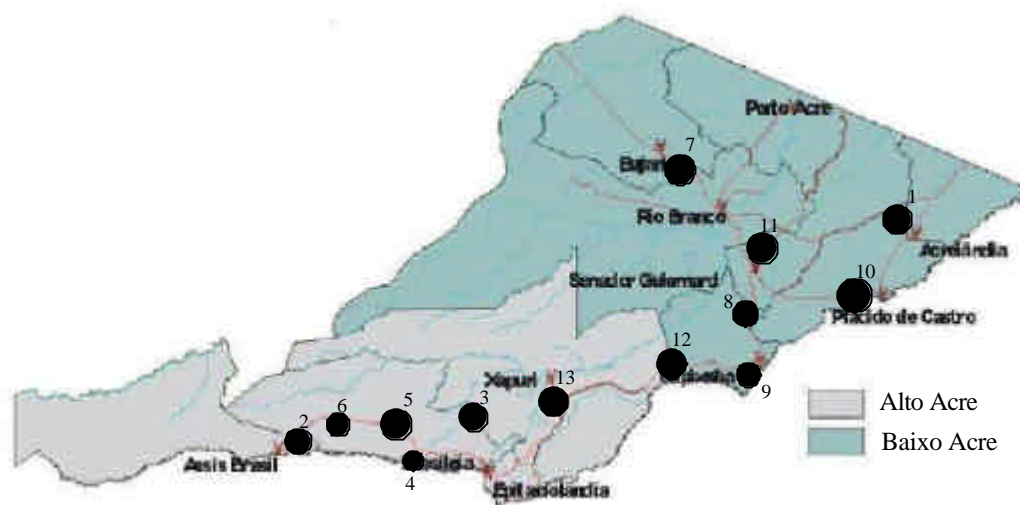


Figura 08 - Distribuição espacial e grau de polimorfismo das populações naturais de pimenta longa no Vale do Acre. O tamanho das esferas é proporcional ao grau de polimorfismo.

O agrupamento das distâncias genéticas entre populações, em função de f_{ST} , resultou na formação de dois grupos distintos de populações (Figura 09), os quais correspondem às duas regiões geográficas do Vale do Acre: o Alto Acre e o Baixo Acre. O dendrograma construído pelo método UPGMA mostrou uma tendência das populações se agruparem de acordo com sua localização geográfica, evidenciando uma estruturação da variabilidade genética das populações no espaço. O teste de Mantel para avaliação da significância da correlação cofenética das distâncias genéticas com as distâncias geradas pelo dendrograma foi altamente significativo, com $r = 0,90$ e $p = 0,001$, evidenciando uma boa consistência na formação dos grupos.

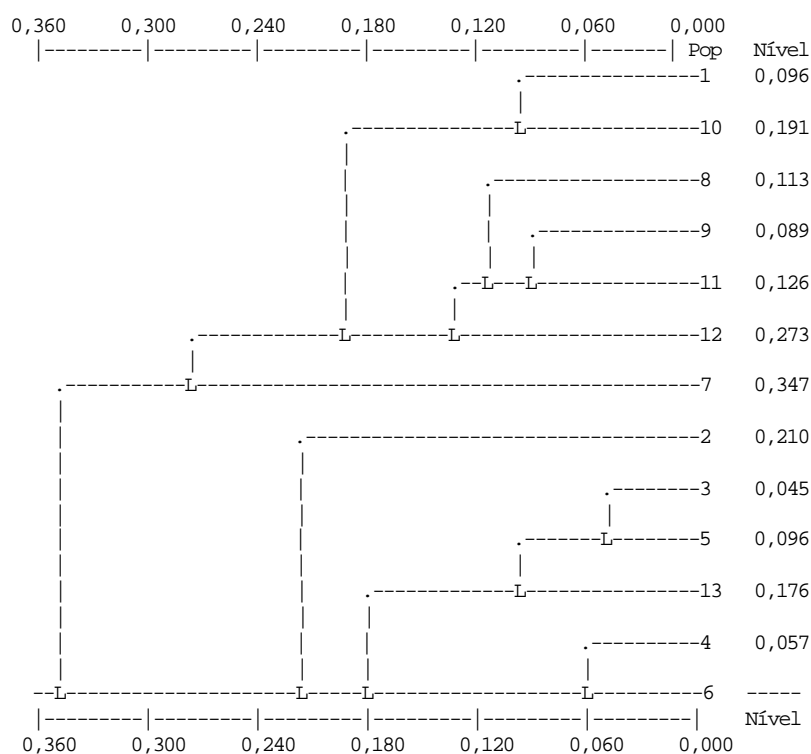


Figura 09 - Dendrograma do agrupamento das distâncias genéticas (f_{ST}) entre pares de populações, pelo método UPGMA. Pop 1: Acrelândia; Pop 2: Assis Brasil; Pop 3: Brasiléia, ramal 13 da BR 317; Pop 4: Brasiléia, ramal 17 da BR 317; Pop 5: Brasiléia, ramal 54 da BR 317; Pop 6: Brasiléia, ramal 78 da BR 317; Pop 7: Bujari; Pop 8: Capixaba, alcobaça; Pop 9: Capixaba, ramal Bolívia; Pop 10: Plácido de Castro; Pop11: Senador Guiomard; Pop 12: Xapuri, Araci; Pop 13: Xapuri, Marcos.

Como a população natural amostrada no município de Assis Brasil se mostrou pamítica (item 5.2), as frequências alélicas de cada população foram estimadas e utilizadas para cálculo da distância genética de Nei (1972) entre elas, a fim de se comparar os resultados de agrupamento obtidos por esta metodologia com os das distâncias genéticas estimadas via f_{ST} . Conforme pode-se observar na Figura 10, o agrupamento gerado em função das frequências alélicas foi praticamente igual ao obtido com as distâncias genéticas calculadas pela AMOVA (f_{ST}). No entanto, a correlação cofenética entre as distâncias geradas no dendrograma e as distâncias genéticas de Nei entre populações foi menor ($r = 0,75$), embora tenha sido significativa. Isto indica que o agrupamento das

populações formado pelas distâncias genéticas estimadas pela AMOVA foi mais consistente.

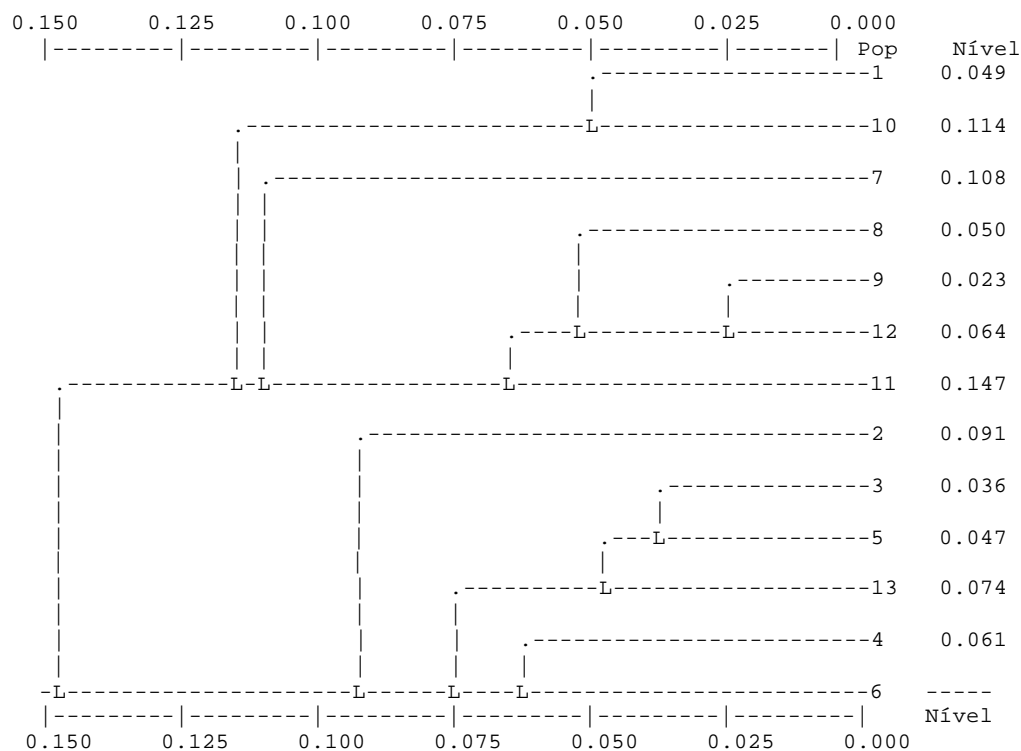


Figura 10 - Dendrograma do agrupamento das distâncias genéticas de Nei (1972) entre populações, pelo método UPGMA. Pop 1: Acrelândia; Pop 2: Assis Brasil; Pop 3: Brasília, ramal 13 da BR 317; Pop 4: Brasília, ramal 17 da BR 317; Pop 5: Brasília, ramal 54 da BR 317; Pop 6: Brasília, ramal 78 da BR 317; Pop 7: Bujari; Pop 8: Capixaba, alcobaça; Pop 9: Capixaba, ramal Bolívia; Pop 10: Plácido de Castro; Pop11: Senador Guiomard; Pop 12: Xapuri, Araci; Pop 13: Xapuri, Marcos.

A correlação entre as matrizes de distância genética das populações, calculadas pelas duas metodologias (f_{ST} e Nei) foi altamente significativa ($r = 0,81$, $p = 0,001$), evidenciando que as estimativas geradas pela AMOVA foram bastante consistentes. Este resultado permite, ainda, inferir sobre a panmixia da espécie, sugerindo que todas as populações avaliadas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O número de alelos privados a determinada população variou de dois a um (Figura 11), e embora tenham sido poucos os alelos, o número de populações que apresentaram

este tipo de alelo foi alto (31%), indicando ou um fluxo gênico restrito entre as populações ou deriva genética devido ao efeito fundador.

Avaliando-se os marcadores RAPD que ocorreram nas regiões do Alto Acre e Baixo Acre, pôde-se observar a ocorrência de alelos privados a regiões também (Figura 11), sendo que praticamente não houve diferenças no número de alelos privados entre as duas regiões. Na região do Alto Acre, a maioria dos alelos privados ocorreu em apenas uma ou duas populações, enquanto que no Baixo Acre a proporção dos locos RAPD em que o marcador esteve presente na maioria das populações foi maior (Anexo I). Além desses resultados, observaram-se diferenças nas frequências de alelos para as duas regiões, onde determinados alelos apresentaram frequências bastante diferentes nas duas regiões (Figura 12). Apesar dessas diferenças entre regiões, o grau de polimorfismo (critério de 99%) em cada uma das regiões (calculado pelas frequências alélicas – TFPGA) foi o mesmo (70,45%), evidenciando que as duas regiões apresentam o mesmo nível de diversidade genética.

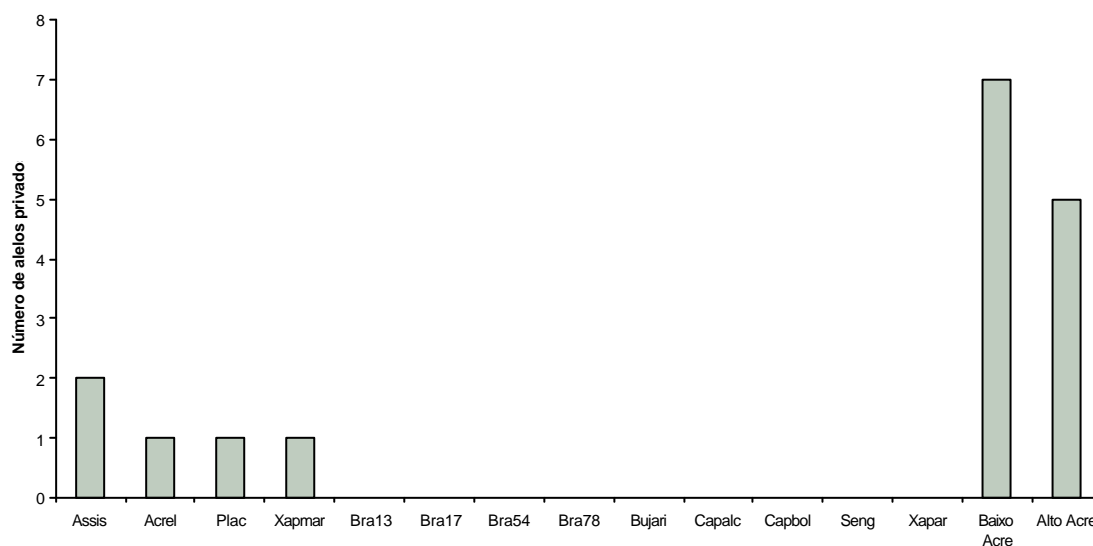


Figura 11 - Número de marcadores RAPD privados observados em cada população de pimenta longa e nas regiões do Alto Acre e Baixo Acre.

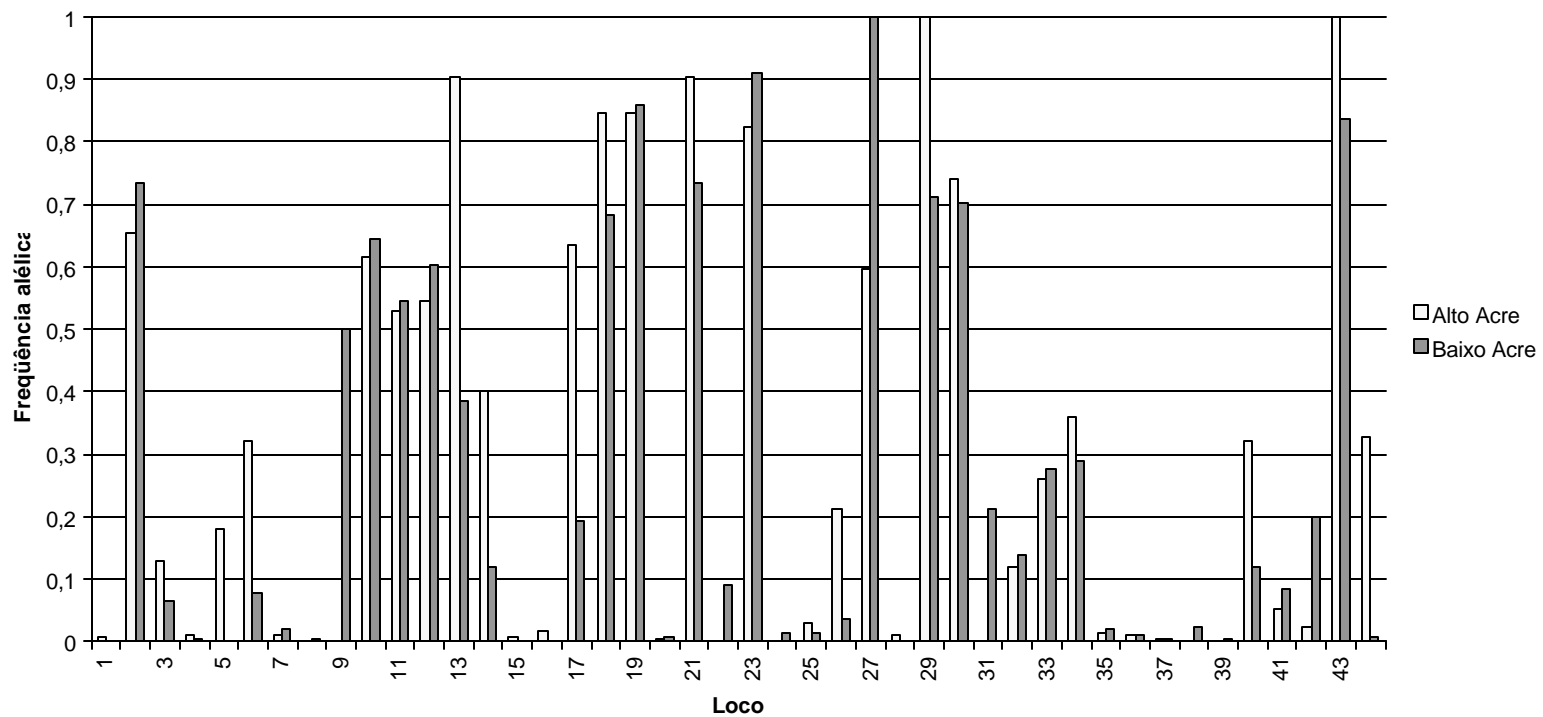


Figura 12 - Frequências alélicas de cada loco RAPD analisado para as populações naturais de pimenta longa das regiões do Alto Acre e Baixo Acre.

A análise da variância molecular (AMOVA) mostrou que a maioria da variação genética se encontra entre indivíduos, dentro de populações. No entanto, houve uma significativa estrutura genética das populações ($\phi_{ST} = 0,281$) (Tabela 05), o que não seria esperado para uma espécie alógama (Loveless & Hamrick, 1984) com dispersão de sementes a longas distâncias. A partição da diversidade genética em três níveis hierárquicos mostrou que 20,61% da diversidade total está distribuída entre regiões; 14,33% entre populações, dentro de regiões; e 65,07% entre indivíduos, dentro de população (Tabela 05). Esta distribuição da diversidade genética evidencia uma diferenciação bem clara entre regiões, confirmando os resultados obtidos pelas análises de agrupamento das populações naturais.

Tabela 05. Resumo da análise de variância molecular (AMOVA) e estimativas de fluxo gênico (Nm) calculadas pelo método de Wright (1931).

| População | Fonte de variação | % Total | p | Estatística f | Nm |
|------------------|---------------------------------------|---------|--------|---------------------|-------|
| Todas (2 níveis) | Entre populações | 28,10 | <0,001 | $\phi_{ST} = 0,281$ | 0,640 |
| | Entre indivíduos dentro de populações | 71,90 | | | |
| Todas (3 níveis) | Entre regiões | 20,60 | <0,001 | $\phi_{CT} = 0,206$ | 0,963 |
| | Entre populações dentro de regiões | 14,33 | <0,001 | $\phi_{SR} = 0,180$ | 1,139 |
| | Dentro de populações | 65,07 | <0,001 | $\phi_{ST} = 0,349$ | |

A estrutura genética das populações, avaliada por meio das frequências alélicas estimadas pela expansão de Taylor (Lynch & Milligan, 1994), esteve de acordo com os resultados obtidos pela AMOVA (Tabela 06), onde se observou uma significativa estruturação das populações naturais de pimenta longa. No entanto, esta análise mostrou uma menor diferenciação entre regiões quando comparada com as estimativas geradas pela AMOVA. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, em que estimativas da estrutura genética obtidos por dados dominantes geralmente são superestimados quando comparados com os resultados obtidos com dados co-dominantes (Isabel et al., 1995; Ayres & Ryan, 1999; Wu et al., 1999).

Estimativas de ϕ , considerando as regiões do Vale do Acre em análises separadas, mostraram que a região do Baixo Acre apresenta valor de ϕ ligeiramente superior ao

encontrado para o Alto Acre (Tabela 06), sugerindo que o fluxo gênico no Baixo Acre é menor ou que a formação das populações dessa região ocorreu de forma mais independente que no Alto Acre.

Tabela 06. Estimativas da variação genética entre populações como um todo, entre regiões, entre populações dentro de regiões e entre populações de cada região, calculadas pela estatística- q e estimativa do fluxo gênico aparente em função de q_{ST} .

| Varição Genética | Estatística q | Nm |
|------------------------------------|-----------------|-------|
| Entre populações como um todo | $q_P = 0,2526$ | 0,740 |
| Entre regiões | $q_P = 0,1322$ | 1,655 |
| Entre populações incluindo regiões | $q_S = 0,3015$ | 0,579 |
| Entre populações do Alto Acre | $q_P = 0,1839$ | 1,109 |
| Entre populações do Baixo Acre | $q_P = 0,2045$ | 0,970 |

O fluxo gênico aparente, estimado pelo número de imigrantes a cada geração (Nm) em função das estatísticas- f , tanto entre populações como entre regiões, foi menor que um, indicando que este não é suficiente para evitar a diferenciação genética entre as populações devido à deriva (Tabela 05). Dentro das regiões, a estimativa do fluxo gênico aparente foi um pouco maior, evidenciando, pela análise de variância molecular, que a diferenciação entre populações dentro de cada região é pequena. Resultados contrários a estes foram observados quando se analisou o fluxo gênico aparente, calculado pelos thetas. O valor de Nm entre as regiões foi maior do que um e dentro das mesmas, menor do que um, mostrando uma estruturação da variação genética dentro das regiões, porém nenhuma estrutura entre as mesmas.

Considerando todas as populações do Vale do Acre, a correlação entre as distâncias genéticas (f_{ST}) e geográficas de cada par de população foi altamente significativa ($r = 0,77$, $p < 0,001$) e o gráfico obtido (Figura 13) mostra que até uma distância de 150 Km existe uma relação direta entre a distância genética e geográfica das populações. Esse resultado indica que, de uma maneira geral, o efeito do fluxo gênico se

propaga até cerca de 150 Km e que a partir desta distância as populações se comportam como independentes entre si.

Fazendo-se esta mesma análise dentro de cada região, a correlação entre a distância genética e a geográfica das populações naturais de pimenta longa da região do Alto Acre foi significativa apenas a 93% ($r = 0,46$, $p = 0,071$) e entre as populações da região do Baixo Acre, o valor de r foi 0,68 com probabilidade $p = 0,006$, apresentando uma correlação da estrutura genética das populações com a distribuição geográfica das mesmas mais significativa. As Figuras 14 e 15 demonstram essas correlações.

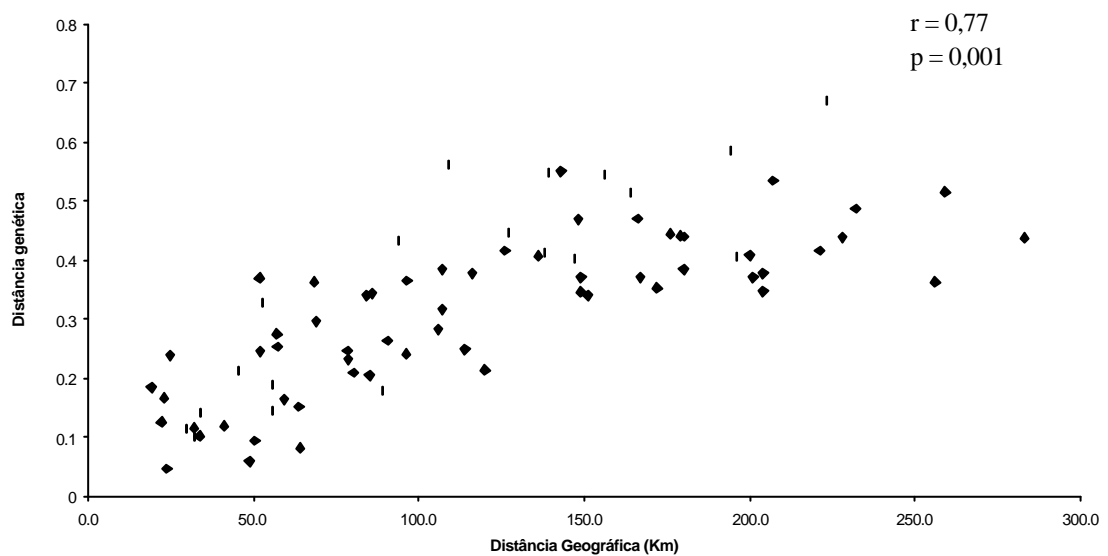


Figura 13 - Distribuição da distância genética (F_{ST}) entre pares de populações naturais de pimenta longa do Vale do Acre em relação à distância geográfica das mesmas.

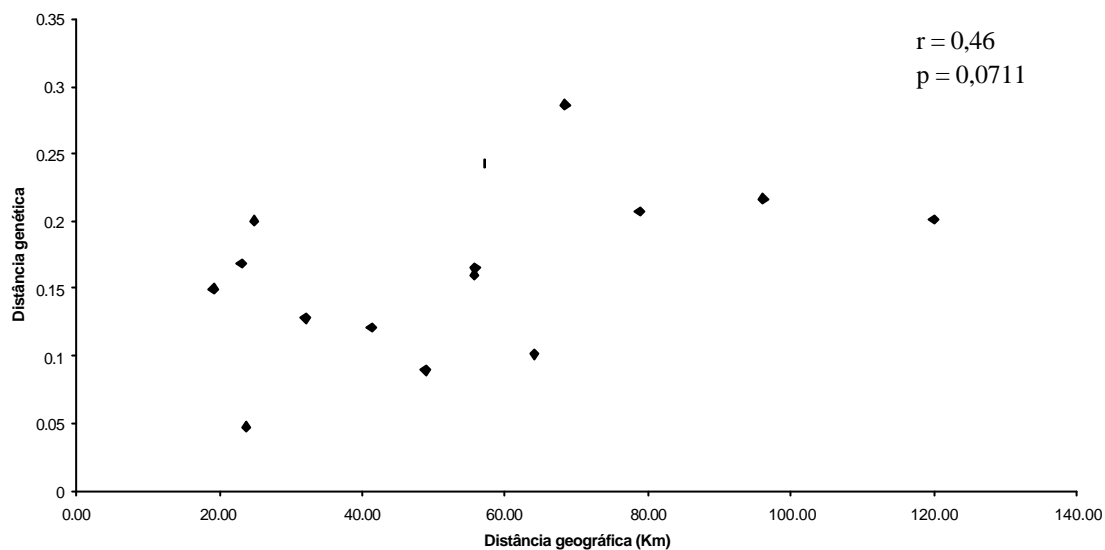


Figura 14 - Distribuição da distância genética (F_{ST}) entre pares de populações naturais de pimenta longa do Alto Acre em relação à distância geográfica das mesmas.

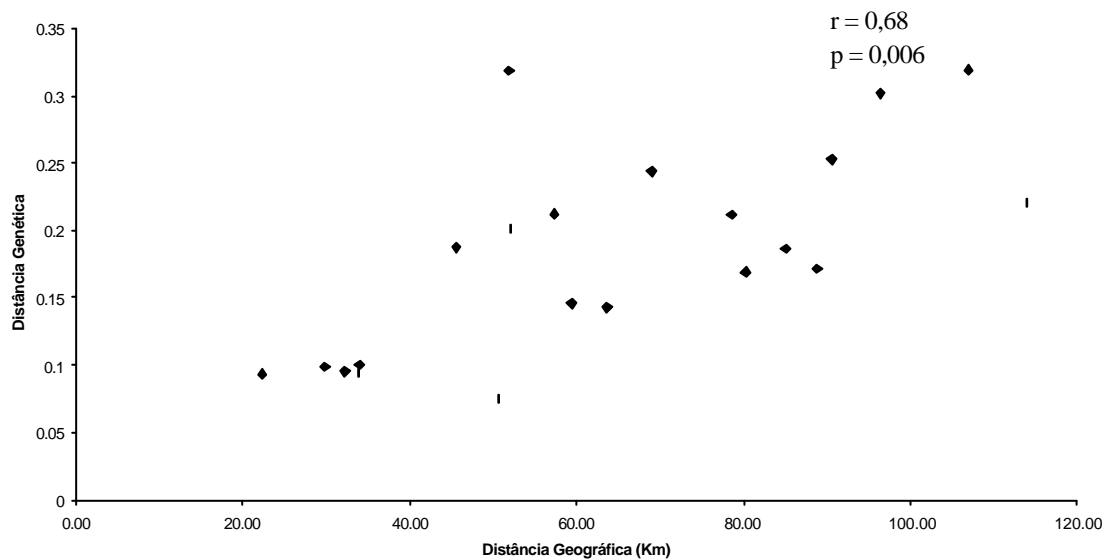


Figura 15 - Distribuição da distância genética (F_{ST}) entre pares de populações naturais de pimenta longa do Baixo Acre em relação à distância geográfica das mesmas.

5.2 - Taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia na população natural de *Piper hispidinervum* de Assis Brasil

Os nove *primers* utilizados neste estudo (OP-D02, OP-D11, OP-D12, OP-B11, OP-AA11, OP-AA19, OP-AB01, OP-AB05 e OP-AB18) geraram 25 locos adequados para estimativas do sistema de cruzamento da população analisada (Tabela 07), os quais foram utilizados no programa MLDT. Cada loco foi testado separadamente para a aderência ao modelo de sistema misto de reprodução e, dos 25 locos testados, 16 aderiram ao modelo (Tabela 08), sendo por isso utilizados para estimar os parâmetros populacionais do sistema de cruzamento. A Figura 16 ilustra o padrão de bandas amplificadas com dois *primers* e duas famílias de pimenta longa.

As estimativas das taxas de cruzamento multilocos (tm) e de locos individuais (ts) foram 1,033 e 1,139, respectivamente, evidenciando que a população estudada é preferencialmente alógama. A diferença $tm - ts$ foi -0,096, indicando que os cruzamentos ocorrem preferencialmente entre indivíduos não-aparentados.

A estimativa do coeficiente de endogamia da geração parental (F) foi 0,05, não diferindo de zero e, portanto, evidenciando a condição de panmixia da população. O valor calculado para o coeficiente de endogamia aparente nas progênes foi - 0,016, o que também não difere de zero, indicando que a população está em equilíbrio de Wright.

Estimativas da taxa tm de cruzamento natural nas famílias (Tabela 09) evidenciam que o modo de reprodução por cruzamento é bastante consistente de família para família, pelo fato dos valores de tm maiores e menores do que 1,00 terem sido balanceados (9 e 9, respectivamente). Sete famílias apresentaram valores de tm iguais a 2,00, indicando problemas na estimativa da taxa de cruzamento dessas famílias. Ritland (1990) explica que o método utilizado para as estimativas de tm das famílias (método de Newton-Raphson) pode ser muito agressivo no caso de famílias com pouca informação sobre a taxa de cruzamento, tendendo a travar as estimativas em 2,00. O autor coloca que este problema geralmente ocorre em famílias com múltiplos pais heterozigotos.

Tabela 07. *Primers* utilizados para estimativas dos parâmetros populacionais do sistema de cruzamento da população natural de pimenta longa de Assis Brasil, com suas respectivas seqüências de bases nucleotídicas bem como o número de marcadores amplificados e analisados.

| <i>Primer</i> | Seqüência 5' – 3' | Marcadores RAPD | |
|---------------|----------------------|-----------------|---------|
| | | Ampl. | Analís. |
| OP-D02 | GGACCCAACC | 9 | 2 |
| OP-D11 | AGCGCCATTG | 9 | 2 |
| OP-D12 | CACCGTATCC | 5 | 3 |
| OP-B11 | GTAGACCCGT | 10 | 5 |
| OP-AA11 | ACCCGACCTG | 15 | 1 |
| OP-AA19 | TGAGGCCGTT | 12 | 2 |
| OP-AB01 | CCGTCGGTAC | 6 | 2 |
| OP-AB05 | CCCGAAGCGA | 13 | 3 |
| OP-AB18 | CTGGCGTGTC | 10 | 5 |
| Total | | 89 | 25 |

Tabela 08. Teste de qui-quadrado para aderência de cada loco RAPD ao modelo misto de reprodução. Locos em negrito foram excluídos da análise das estimativas das taxas de cruzamento por não aderirem ao modelo misto de reprodução.

| Cod. Loco | Loco | Qui-quadrado total |
|--------------|--------------|-----------------------|
| 1 | AB1a | 0,23 |
| 2 | AB1b | 3,43 |
| 3 | AB5a | 0,14 |
| 4 | AB5b | 10,73 |
| 5 | AB5c | 1,10 |
| 6 | D12b | 0,06 |
| 7 | D12c | 0,06 |
| 8 | D2a | 0,81 |
| 9 | D2b | 1,91 |
| 10 | AB18a | 0,04 |
| 11 | AB18b | 5,73 |
| 12 | AB18c | nc |
| 13 | AB18d | nc |
| 14 | AB18f | 31,04 |
| 15 | B11a | 0,04 |
| 16 | B11b | 5,50 |
| 17 | B11c | 6,58 |
| 18 | B11d | 4,42 |
| 19 | B11e | 4,27 |
| 20 | AA11a | 2,44 |
| 21 | D12a | 0,11 |
| 22 | D11c | 0,04 |
| 23 | D11d | 1,58 |
| 24 | AA19a | 20,37 |
| 25 | AA19b | 0,07 |

nc: valor de qui-quadrado não convergiu.

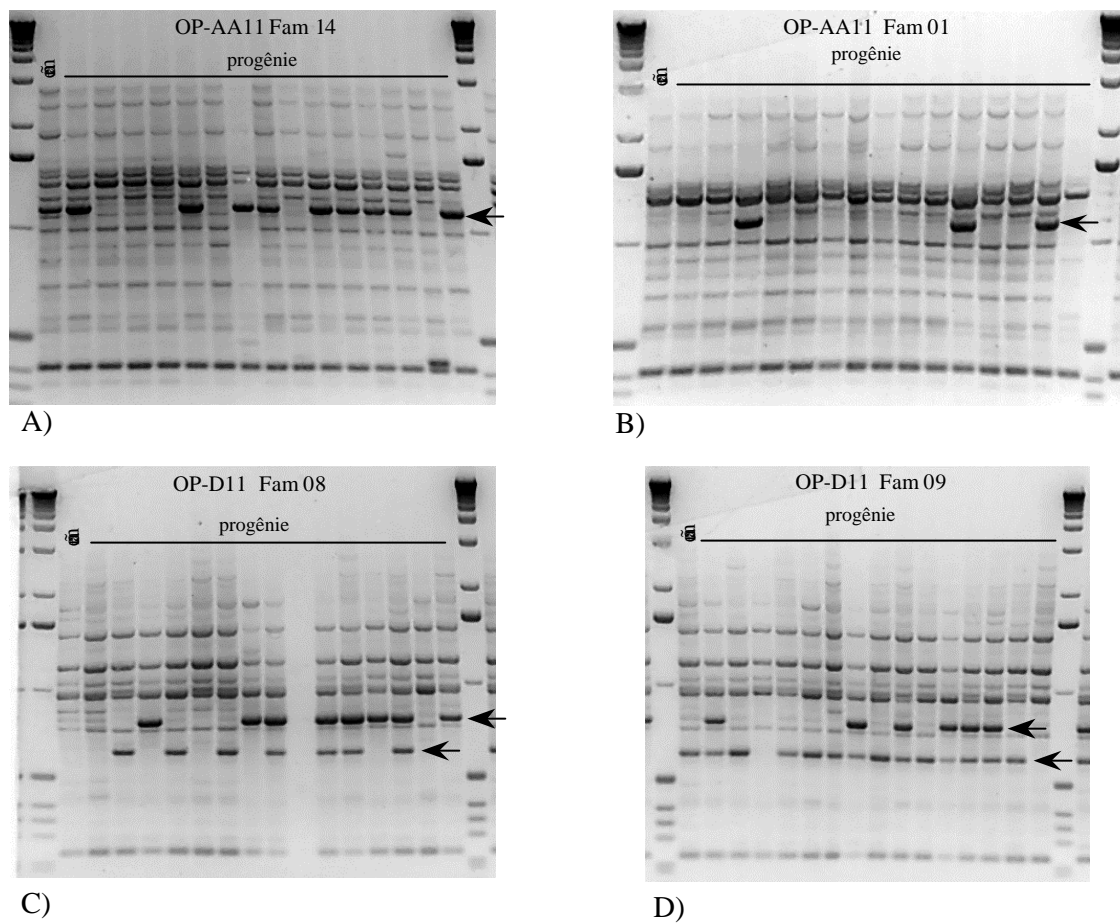


Figura 16 - Padrão de bandas (marcadores) amplificadas para as progênies 14 e 01, com o *primer* OP-AA11 (A e B) e para as progênies 08 e 09, com o *primer* OP-D11 (C e D), da população natural de pimenta longa de Assis Brasil. As setas indicam os marcadores avaliados.

Tabela 09. Estimativas das taxas de cruzamento multilocos (t_m) e o erro padrão para cada família amostrada na população natural de pimenta longa de Assis Brasil.

| Família | t_m | Erro Padrão |
|----------------|-------------------------|--------------------|
| Fam 01 | 0,77 | 0,21 |
| Fam 02 | 1,39 | 0,37 |
| Fam 03 | 1,06 | 0,33 |
| Fam 04 | 2,00 | 0,00 |
| Fam05 | 2,00 | 0,00 |
| Fam 06 | 0,80 | 0,17 |
| Fam 07 | 1,87 | 0,16 |
| Fam 08 | 2,00 | 0,00 |
| Fam 09 | 1,10 | 0,24 |
| Fam 10 | 2,00 | 0,00 |
| Fam 11 | 1,24 | 0,26 |
| Fam 12 | 2,00 | 0,00 |
| Fam 13 | 1,02 | 0,22 |
| Fam 14 | 0,81 | 0,18 |
| Fam 15 | 0,94 | 0,28 |
| Fam 16 | 0,88 | 0,30 |
| Fam 17 | 2,00 | 0,00 |
| Fam 18 | 0,88 | 0,23 |
| Fam 19 | 1,22 | 0,43 |
| Fam 20 | 0,96 | 0,25 |
| Fam 21 | 0,96 | 0,35 |
| Fam 22 | 1,08 | 0,46 |
| Fam 23 | 0,90 | 0,21 |
| Fam 24 | 1,05 | 0,32 |
| Fam 25 | 2,00 | 0,00 |

Tabela 10. Frequência alélica e erro padrão para cada loco RAPD avaliado na população natural de pimenta longa de Assis Brasil.

| Loco | Frequência alélica | Erro Padrão |
|-------------|---------------------------|--------------------|
| 01 | 0,499 | 0,031 |
| 02 | 0,106 | 0,013 |
| 03 | 0,359 | 0,032 |
| 05 | 0,020 | 0,007 |
| 06 | 0,021 | 0,007 |
| 07 | 0,037 | 0,009 |
| 08 | 0,069 | 0,013 |
| 09 | 0,390 | 0,027 |
| 10 | 0,140 | 0,017 |
| 15 | 0,158 | 0,019 |
| 20 | 0,281 | 0,024 |
| 21 | 0,553 | 0,032 |
| 22 | 0,220 | 0,022 |
| 23 | 0,456 | 0,031 |
| 25 | 0,040 | 0,009 |

As frequências genóticas dos indivíduos de pimenta longa amostrados na população natural de Assis Brasil (genótipos maternos – Anexo II) estiveram, de modo geral, dentro das frequências esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, a uma probabilidade de 5% (1.000 repetições de reamostragem). A estimativa do coeficiente de endogamia f não diferiu de zero (Tabela 11), demonstrando, portanto, que não há endogamia na população analisada.

Tabela 11. Estimativa do coeficiente de endogamia f para a população natural de pimenta longa de Assis Brasil.

| Parâmetro | Estimativa | Intervalo de confiança |
|-----------|------------|------------------------|
| f | -0,017 | -0,183 a 0,174 |

5.3 - Diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre

Dos 60 *primers* testados nesta etapa, 16 foram selecionados e utilizados para amplificação em PCR, porém somente 06 (OP-A5, OP-A8, OP-A12, OP-B8, OP-B11 e OP-B12) resultaram em bandas com padrão adequado para leitura e análise. Estes *primers* geraram 66 marcadores, com 96,97% de polimorfismo (Tabela 12). A Figura 17 mostra o resultado da amplificação de fragmentos de DNA (bandas) de 48 genótipos da Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, utilizando-se o *primer* OP-B12.

Tabela 12. Total de marcadores RAPD amplificados, analisados e polimórficos para cada *primer* avaliado com todos os genótipos da Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre.

| PRIMER | SEQÜÊNCIA 5' – 3' | MARCADORES | | |
|-----------------|----------------------|------------|---------|-------|
| | | AMPLIF. | ANALIS. | POLI |
| OP-A05 | AGGGGTCTTG | 14 | 8 | 7 |
| OP-A08 | GTGACGTAGG | 9 | 7 | 7 |
| OP-A12 | TCGGCGATAG | 5 | 4 | 3 |
| OP-B08 | GTCCACACGG | 15 | 15 | 15 |
| OP-B11 | GTAGACCCGT | 19 | 19 | 19 |
| OP-B12 | CCTTGACGCA | 17 | 13 | 13 |
| TOTAL | | 79 | 66 | 64 |
| Porcentagem (%) | | | 83.54 | 96.97 |

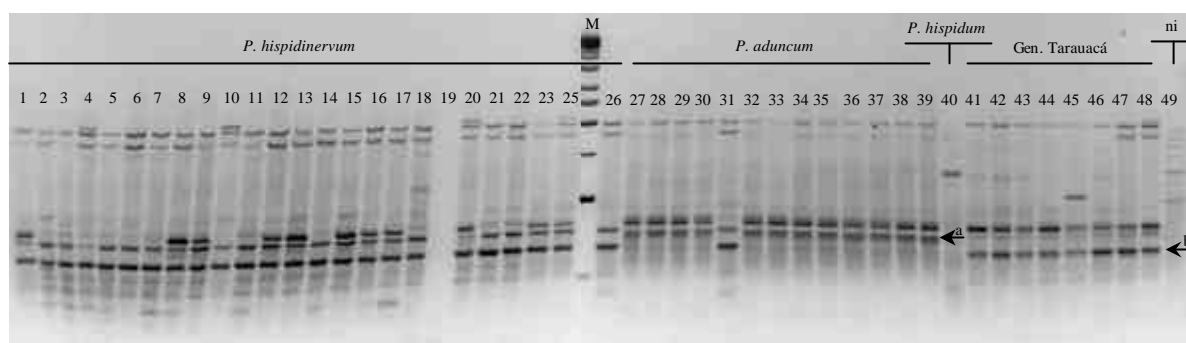


Figura 17 - Padrão de bandas (marcadores) amplificadas com o *primer* OP-B12. Os números de 1 a 49 indicam os genótipos e M = 1Kb ladder. As setas *a* e *b* indicam marcadores diagnósticos para *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, respectivamente.

O número de marcadores amplificados por *primer* variou de 5 a 19, porém nem todos foram utilizados para as análises. Os 66 marcadores analisados representaram 83,54% dos marcadores amplificados, tendo-se uma média de 11 marcadores por *primer*.

Houve uma grande diferença de polimorfismo entre as espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, bem como no número de marcadores amplificados por *primer* (Figura 18). O polimorfismo encontrado para estas espécies foi de 79,4% e 5,3%, respectivamente, mostrando características genéticas distintas. Para *P. hispidinervum*, os 6 *primers* utilizados amplificaram em média 5,67 marcadores por *primer*, enquanto que para *P. aduncum*, esta média foi de 3,17.

A espécie *P. hispidum* não pôde ser avaliada quanto ao polimorfismo, por haver apenas um genótipo representado na Coleção de Germoplasma. Genótipos não identificados botanicamente serão considerados nas análises seguintes, onde a maior parte foi identificada quanto à espécie e apenas um não pôde ter sua identificação confirmada.

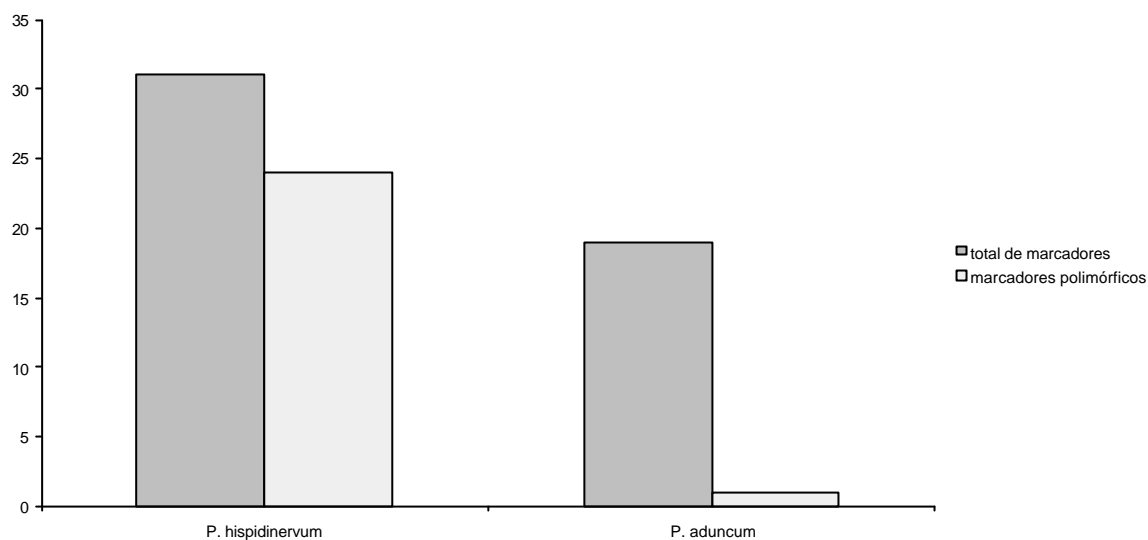


Figura 18 - Total de marcadores amplificados e polimórficos para as espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, utilizando-se seis *primers*.

A análise das similaridades genéticas entre os genótipos, calculadas pelo coeficiente de Jaccard e representadas em dendrograma pelo método UPGMA, resultou em três grandes grupos, os quais podem ser considerados correspondentes às três espécies em estudo, e por isso aqui denominados de hispidinervum, aduncum e hispidum (Figura 19). A correlação cofenética, ou seja, a correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geradas pelo dendrograma, foi significativa ($r = 0,97$, $p < 0,001$), indicando que os grupos formados pelo dendrograma correspondem aos dados genéticos.

Outra análise que testa a formação desses grupos é a consistência dos nós que os formam. Nesta análise, os nós responsáveis pelos grupos denominados de hispidinervum, aduncum e hispidum apresentaram consistência de 98,5%, 100% e 99,8%, respectivamente. Estes resultados evidenciam uma forte consistência para a formação desses nós, pois, no caso do grupo hispidinervum, 98,5% das 1000 vezes (reamostragens) em que o dendrograma foi construído este nó aconteceu com os mesmos genótipos.

Dos dezesseis genótipos não identificados botanicamente (Tabela 03), nove se agruparam com genótipos de *P. hispidinervum*; seis formaram um subgrupo dentro do

grupo denominado de hispidinervum, sendo todos procedentes de Tarauacá; e um genótipo se mostrou distinto dos demais (B 148), embora com alguma similaridade com o genótipo de *P. hispidum*. O genótipo B 113, identificado como *P. aduncum*, não se agrupou com os demais genótipos dessa espécie e sim com os de *P. hispidinervum* (Figura 19), evidenciando um erro de identificação.

5.3.1 - Identificação taxonômica, via marcador RAPD

A análise das frequências dos marcadores em cada espécie, considerando os seis genótipos procedentes de Tarauacá (B137, B142, B138, B139, B141 e B144) como um grupo distinto de *P. hispidinervum*, e o genótipo B148 como do mesmo grupo de *P. hispidum*, evidenciou a ocorrência de vários marcadores exclusivos a um determinado grupo, tendo-se inclusive diferenças entre o grupo de Tarauacá e de *P. hispidinervum* (Tabela 13). Dez marcadores foram exclusivos de *P. hispidinervum*, dez foram exclusivos de *P. aduncum*, três foram exclusivos dos genótipos de Tarauacá, 23 foram exclusivos de *P. hispidum* e outros dez apareceram tanto em *P. hispidinervum* quanto nos genótipos de Tarauacá. Apenas dois marcadores (OP-A5a e OP-A12c), ou 3,03% dos 66 marcadores analisados, foram monomórficos para todos os genótipos, ou seja, apareceram em todos os grupos.

Com base nesses resultados, pôde-se identificar marcadores diagnósticos para as espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum* (Figura 17). Assim, nove marcadores diagnósticos foram identificados para *P. aduncum* e quatro para *P. hispidinervum*, considerando o critério de frequência mínima de 0,90. Todos os marcadores presentes em *P. hispidinervum*, com frequência maior que 0,9, e ausentes nas demais espécies, foram encontrados nos genótipos de Tarauacá com frequência 1,00.

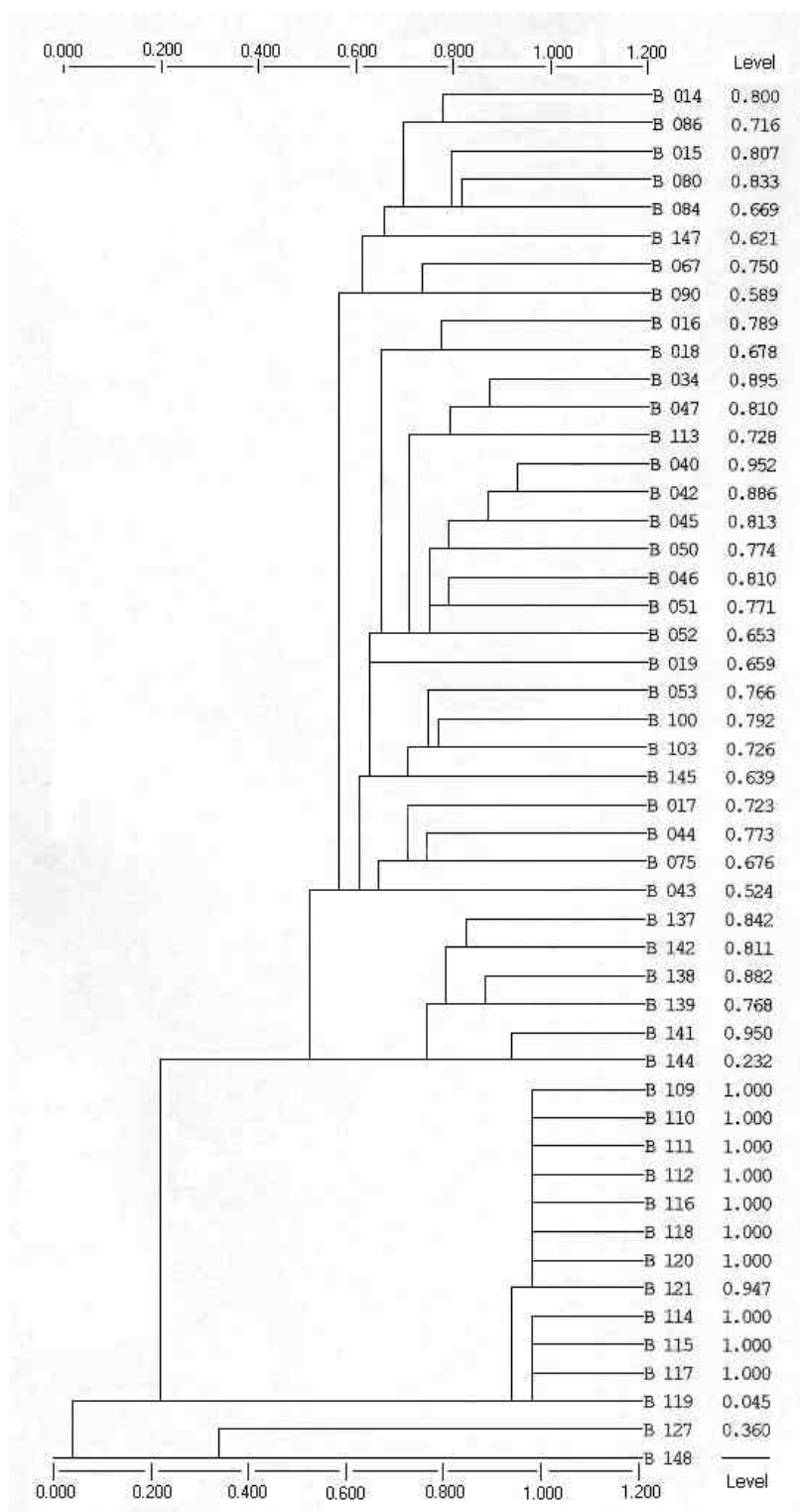


Figura 19 - Dendrograma da similaridade de Jaccard entre os genótipos, pelo método UPGMA.

Tabela 13. Frequência dos marcadores RAPD para cada *primer* e grupos taxonômicos.

| Loco | Frequência do marcador | | | |
|------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | hispidinervum | aduncum | Tarauacá | Hispidum |
| A5a | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| A5b | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| A5c | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| A5d | 0.82 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| A5e | 0.61 | 1.00 | 0.67 | 0.00 |
| A5f | 0.39 | 0.00 | 0.50 | 0.00 |
| A5g | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| A5h | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| A8a | 1.00 | 0.00 | 1.00 | 0.00 |
| A8b | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| A8c | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| A8d | 0.82 | 0.00 | 1.00 | 0.00 |
| A8e | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| A8f | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| A8g | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| A12a | 0.68 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| A12b | 0.64 | 1.00 | 1.00 | 0.00 |
| A12c | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| A12d | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B8a | 0.14 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B8b | 0.86 | 0.00 | 0.83 | 0.00 |
| B8c | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.00 |
| B8d | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| B8e | 0.07 | 0.00 | 0.33 | 0.00 |
| B8f | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B8g | 0.11 | 0.00 | 1.00 | 0.00 |
| B8h | 0.00 | 0.00 | 0.33 | 0.00 |
| B8i | 0.07 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B8j | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B8k | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| B8l | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B8m | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| B8n | 0.54 | 1.00 | 0.83 | 0.00 |
| B8o | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| B11a | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B11b | 0.00 | 0.00 | 0.17 | 0.00 |
| B11c | 0.43 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B11d | 0.32 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B11e | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B11f | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B11g | 0.46 | 0.00 | 0.83 | 0.00 |
| B11h | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| B11i | 0.96 | 0.00 | 1.00 | 0.00 |
| B11j | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| B11k | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |

Continua

Tabela 13. Frequência dos marcadores RAPD para cada *primer* e grupos taxonômicos. (continuação)

| Loco | Frequência do marcador | | | |
|------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | hispidinervum | aduncum | Tarauacá | Hispidum |
| B11l | 0.00 | 0.67 | 0.00 | 0.00 |
| B11m | 1.00 | 0.00 | 1.00 | 0.00 |
| B11n | 0.39 | 1.00 | 1.00 | 0.00 |
| B11o | 0.64 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B11p | 0.57 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B11q | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| B11r | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| B11s | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| B12a | 0.21 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B12b | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.00 |
| B12c | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B12d | 0.96 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B12e | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B12f | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B12g | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B12h | 0.00 | 0.00 | 0.17 | 0.00 |
| B12i | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 |
| B12j | 0.54 | 1.00 | 1.00 | 0.00 |
| B12k | 0.79 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| B12l | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| B12m | 1.00 | 0.00 | 1.00 | 0.00 |

6. DISCUSSÃO

6.1 - *Estrutura genética de populações naturais de P. hispidinervum no Vale do Acre*

Apesar da importância e do interesse econômico da espécie *Piper hispidinervum*, o processo de domesticação e plantio comercial foi iniciado sem o prévio conhecimento de sua variação genética em condições naturais. Alguns estudos para o zoneamento de habitats naturais (Pimentel et al., 1998; Pimentel & Pinheiro, 2000) e caracterização botânica e química da espécie, visando a produção de safrol (Silva & Oliveira, 2000a; Oliveira & Lutz, 1996) foram conduzidos, porém não há na literatura relatos da quantificação e distribuição da variabilidade genética de *Piper hispidinervum*.

Este é o primeiro estudo feito para se avaliar os níveis de diversidade genética e sua distribuição em populações naturais de pimenta longa. A metodologia utilizada para acessar esses dados foi baseada na análise de marcadores RAPD, cuja natureza dominante causa sérios vieses nas estimativas de parâmetros genéticos populacionais, como o decréscimo da heterozigosidade esperada e superestimativas na diferenciação entre populações (Isabel et al., 1995; Wu et al., 1999). A fim de se minimizar esses vieses, todos os marcadores com frequência maior que 98,99% foram descartados das análises de estrutura genética. Ainda que alguns problemas com estimativas enviesadas não pudessem ser solucionados, obtiveram-se resultados similares da estrutura genética de populações naturais de pimenta longa quando esta foi analisada pela AMOVA e pelas frequências alélicas das populações, sugerindo que as estimativas dos índices de fixação obtidas neste trabalho são similares àquelas obtidas por dados co-dominantes. Alguns trabalhos, com outras espécies, têm demonstrado que marcadores RAPD e isoenzimáticos podem gerar resultados similares do nível de diversidade e diferenciação

entre populações (Ayres & Ryan, 1999; Bucci et al., 1997; Le Corre et al., 1997; Wu et al., 1999).

Wu et al., (1999) verificaram em estudo de simulação usando dados de isoenzimas como marcadores dominantes e co-dominantes, que a natureza dominante e bialélica dos marcadores RAPD poderiam explicar as diferenças observadas em parâmetros de diferenciação, mas não em diversidade gênica. Neste estudo, os autores apontam vários motivos para as maiores estimativas dos parâmetros genéticos populacionais dado por marcadores RAPD quando comparados com isoenzimas. O primeiro deles seria que isoenzimas amostram apenas genes funcionais, enquanto que RAPD amostra, aleatoriamente, regiões do genoma tanto codantes como repetitivas, sendo que seqüências repetitivas de DNA divergem e mudam rapidamente, apresentando maior polimorfismo. A técnica de PCR utilizada para obtenção dos marcadores RAPD é muito mais sensível a diferentes tipos de mutações do que a eletroforese de isoenzimas. O terceiro motivo se baseia na hipótese de que regiões de telômeros e minissatélites evoluem muito mais rápido que locos isoenzimáticos, e são preferencialmente representados nos fragmentos de RAPD (Black et al., 1992). Outro motivo seria que isoenzimas podem sofrer seleção natural por representarem produtos gênicos funcionais. Isso pode sugerir que as enzimas estão sob influência de seleção balanceada, o que ajudaria na manutenção do polimorfismo intrapopulacional, e redução na diferenciação entre populações.

Os resultados de RAPD obtidos neste estudo demonstraram níveis altos de variabilidade genética para a espécie, o que é de grande importância para sua manutenção, servindo como uma fonte de variação para adaptação à mudanças em fatores bióticos como pragas e doenças, principalmente por se tratar de uma espécie de ocorrência natural restrita.

No entanto, o nível de polimorfismo encontrado para cada população foi baixo, em que menos de 50% dos locos RAPD foram polimórficos, evidenciando uma certa diferenciação entre populações. Embora não se tenha feito análise do número de fenótipos diferentes em cada população, acredita-se que a elevada taxa de monomorfismo se deva mais à ocorrência de alelos raros e alguns privados a

determinadas populações do que à homogeneidade genética entre indivíduos da mesma população. Se a constituição genética das populações é muito diferente, espera-se ocorrer vários locos monomórficos para ausência de bandas em algumas populações. Ainda que não se tenha evidenciado a ocorrência de clones nas populações, essa hipótese não pode ser descartada, pois várias espécies de *Piper* apresentam facilidade para o enraizamento de ramos a partir de seus nós. Figueiredo (1997) relacionou a grande capacidade de colonização e ampla distribuição das Piperaceae com a ocorrência de autopolinização, propagação vegetativa e dispersão de pólen por vento e insetos.

A análise de agrupamento das treze populações naturais de pimenta longa, demonstrou a formação de dois grupos distintos correspondentes exatamente à divisão geopolítica que o governo do estado do Acre faz no Vale do Rio Acre, ou seja, o Alto Acre e o Baixo Acre. O grau de polimorfismo observado nessas duas regiões foi o mesmo, sugerindo que não existe diferença no nível de diversidade genética entre as duas regiões. No entanto, analisando-se as frequências alélicas dos locos RAPD e o agrupamento das populações em cada uma dessas regiões, observam-se diferenças na estrutura genética de cada região.

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações evidenciou a presença de certa estrutura genética, a qual foi correlacionada com a distribuição espacial das populações. A alta correlação observada entre as distâncias geográficas e genéticas das populações avaliadas evidencia a existência de um fluxo gênico que se propaga até cerca de 150 Km e que a estrutura genética apresenta um padrão de isolamento por distância.

Embora as estimativas de fluxo gênico aparente tenham dado, na sua maioria, valores baixos, indicando que este não seria suficiente para neutralizar a diferenciação genética entre populações causada pela deriva genética, acredita-se que a diferenciação observada entre as populações e regiões seja devido a vários fatores da história de vida das populações e não ao fluxo gênico restrito. Vale ressaltar aqui que o fluxo gênico estimado nesse trabalho refere-se ao fluxo aparente, o qual reflete o que ocorreu em gerações passadas.

Teoricamente, espécies cuja dispersão de sementes é feita por animais que se movem a longas distâncias, tendem a apresentar altos valores para fluxo gênico e variação genética dentro de população, sendo a diferenciação entre populações pequena (Hamrick & Loveless, 1986). No entanto, mesmo que as sementes sejam dispersas a longas distâncias, o modo de dispersão pode influenciar a estrutura genética das populações. Sementes ingeridas por animais são defecadas ou regorgitadas em aglomerados (Fleming & Heithaus, 1981), e geralmente essas sementes são derivadas de indivíduos aparentados (Hamrick & Loveless, 1986). Neste caso, a ocupação de áreas não colonizadas, em que ocorrem poucos episódios de dispersão, resulta em grande diferenciação entre populações devido ao efeito fundador.

Na literatura, há citações de que a dispersão de sementes da pimenta longa é feita principalmente por morcegos (Silva & Oliveira, 2000b; Almeida, 1999). Fleming (1981) verificou que frutos de *Piper amalago* são coletados por morcegos e levados aos puleiros para serem ingerido durante à noite, sendo que na coleta do dia seguinte as sementes são defecadas. Este modo de dispersão, embora favoreça o fluxo gênico a longas distâncias, resulta numa distribuição de sementes e plântulas altamente aglomerada (Hamrick & Loveless, 1986).

Heywood & Fleming (1986), avaliando o padrão de variação isoenzimática em populações de três espécies de *Piper*, na Costa Rica, onde a dispersão de sementes é feita exclusivamente por morcegos, também encontraram alta diferenciação genética entre populações. Os autores atribuíram esses resultados ou ao efeito fundador (Nei et al., 1975) ou ao fluxo gênico restrito entre as populações (Wright, 1943; Kimura & Weiss, 1964).

Como a pimenta longa é uma espécie pioneira que coloniza rapidamente grandes áreas, gerando populações densas, o estabelecimento de novas plantas oriundas do banco de sementes é dependente de aberturas na vegetação para incidência de luz. O trabalho conduzido por Almeida (1999) mostrou que esta espécie apresenta banco de sementes restrito, pois as sementes dispersas perdem rapidamente o poder de germinação, mas a constante produção de sementes mantém um banco de sementes no solo quase o ano todo. Portanto, praticamente não deve existir sobreposição de gerações no banco de

sementes, o que contribui para a maior homogeneidade da população e consequente diferenciação entre populações.

O evento de colonização que gerou as populações da região do Baixo Acre deve ter sido independente do que ocorreu no Alto Acre. Além do processo de ocupação humana (desmatamento) das duas regiões ter ocorrido em épocas distintas, o histórico das populações de pimenta longa das duas regiões é um pouco diferente, sendo que as populações do Alto Acre sofreram menor intervenção do homem no sentido de tentar eliminá-las. Todos esses fatos, sugerem que as populações de pimenta longa do Baixo Acre são mais antigas e as plantas amostradas devem ser resultado de várias gerações de acasalamento, enquanto que as populações do Alto Acre devem ser mais recentes.

Embora não existam estudos apontando a origem da espécie *P. hispidinervum* acredita-se que as populações que colonizam áreas antropizadas sejam oriundas de indivíduos que ocupam áreas de *stress* na floresta primária. A análise da distribuição espacial e do grau de polimorfismo das populações naturais estudadas, evidencia que, de modo geral, as populações mais homogêneas estão situadas mais na periferia do estado. Estes resultados sugerem a existência de um eixo de maior diversidade genética, que poderia ser o centro de diversidade da espécie. O agrupamento melhor definido das populações da região do Alto Acre pode ser explicado em função de suas origens, em que as populações 3, 5 e 13 foram próximas geneticamente e apresentaram maior diversidade que as demais. Provavelmente estas populações são mais antigas e oriundas de um *pool* gênico semelhante, enquanto que as populações 4 e 6 podem ser expansões da área de colonização, observando-se menor diversidade intrapopulacional. A população de Assis Brasil (2) deve ter sido colonizada por um evento independente das demais. O mesmo raciocínio pode ser feito para a região do Baixo Acre, em que as populações 8 e 9 devem ser mais recentes.

Como este estudo foi feito a partir de uma única amostragem e não se tem informações da história de vida das populações, fica difícil concluir sobre as causas que levaram à estrutura genética evidenciada. Hamrick & Loveless (1986) comentam que um dos principais problemas em se interpretar a estrutura genética de populações é que diferentes parâmetros evolucionários podem agir isoladamente ou em conjunto gerando

padrões similares de distribuição da variação genética. Neste estudo, verificou-se uma estrutura genética das populações altamente correlacionada com a distribuição espacial das mesmas. No entanto, não existem motivos aparentes para a restrição de fluxo gênico entre populações, sendo que a diferenciação genética observada entre as mesmas pode ser explicada, talvez, pelo efeito de amostragem gênica durante a colonização e uma dinâmica evolutiva mais pronunciada quando comparada com a evolução observada em populações de espécies arbóreas da floresta tropical, em que o ciclo de vida é mais longo.

Resultados similares da estrutura genética de populações naturais encontrados neste estudo foram observados para a espécie *Piper cernuum* (Mariot, 2000), em que a diferenciação genética entre quatro populações da Mata Atlântica foi elevada ($F_{ST} = 0,29$), com forte estruturação espacial. O autor atribuiu a diferenciação encontrada ao efeito fundador das populações, visto ser uma espécie pioneira que coloniza clareiras dentro da floresta.

Trabalhos semelhantes, conduzidos com outros tipos de pioneiras de fecundação cruzada (Alvarez-Buylla & Garay, 1994; Keys & Smith, 1994), não demonstram valores tão altos de F_{ST} quanto aos encontrados neste trabalho e no de Mariot (2000). A estrutura genética de *Cecropia obtusifolia*, na região de Los Tuxtlas (México), apresentou pouca diferenciação genética entre populações (F_{ST}), nenhuma endogamia e nenhum padrão claro de isolamento por distância (Alvarez-Buylla & Garay, 1994). Embora esta espécie também seja uma pioneira, a distribuição da variabilidade genética foi totalmente diferente do encontrado para as espécies de *Piper*, confirmando os dois postulados teóricos para a organização genética de espécies pioneiras citados por Alvarez-Buylla & Garay (1994).

Kageyama et al. (1992b) observaram o comportamento de algumas espécies que ocorrem em ambientes de *stress* na floresta primária, e que ao encontrarem ambientes perturbados ou degradados (definidos como áreas antropizadas) se estabelecem como populações densas e às vezes quase puras. Este tipo de comportamento foi caracterizado pelos autores como típico de espécies, definidas por eles, de pioneiras antrópicas, as quais seriam diferentes das pioneiras típicas definidas por Budowski (1965).

Provavelmente, os dois padrões de distribuição da variabilidade genética entre populações de pioneiras sejam decorrentes de diferentes dinâmicas de extinção e recolonização associados com a formação de bancos de sementes no solo. Wright (1940) fez uma predição de que espécies pioneiras apresentariam uma subestruturação de populações clara devido ao pequeno número de indivíduos colonizadores, porém Slatkin (1985; 1987) mostrou, usando o modelo de ilhas, que a dinâmica de extinção e recolonização das pioneiras favoreceria o fluxo gênico diminuindo a diferenciação genética entre as populações.

A principal diferença ecológica observada entre as espécies de *Piper* e a *Cecropia* está no tipo de banco de sementes formado por elas, sendo que esta última apresenta banco de sementes permanente no solo (Alvarez-Buylla & Martínez-Ramos, 1990), ocorrendo sobreposição de gerações e, portanto, quando se dá o estabelecimento de novas populações, o efeito da deriva genética já foi minimizado pelo fluxo gênico decorrente da dispersão de sementes. Assim, pode-se dizer que tanto Wright (1940) quanto Slatkin (1985; 1987) estão certos em suas teorias, e que existem dois tipos de pioneiras, conforme proposto por Kageyama et al. (1992b).

6.2 - Taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia de uma população natural de *Piper hispidinervum*

As estimativas da taxa de cruzamento tanto para multilocos como locos individuais foram altas, mostrando que *P. hispidinervum* é preferencialmente alógama e que o cruzamento entre indivíduos aparentados é evitado. As estimativas da taxa de cruzamento obtidas com marcadores RAPD foram coerentes com o valor de tm obtido para outra população de pimenta longa, usando marcadores isoenzimáticos ($tm = 0,921$, dados não publicados).

No gênero *Piper*, existem várias espécies, tendo sido constatado desde espécies autógamas como alógamas. Em um estudo sobre a fenologia e ecologia da polinização de 18 Piperaceas (Figueiredo, 1997), o autor verificou que a maioria das espécies apresentou protoginia incompleta, sendo que a diferença temporal entre a receptividade do estigma e a apresentação de pólen reduziu a autopolinização. Algumas espécies se

apresentaram autocompatíveis e outras não, embora não tenha sido feito estudo específico para auto-incompatibilidade.

Apenas três espécies de *Piper* foram estudadas para auto-incompatibilidade, sendo que uma (*P. methysticum*) se mostrou auto-incompatível (Prakash, 1983) e duas (*P. nigrum* e *P. arieianum*) foram autocompatíveis (Martin & Gregory, 1962; Marquis, 1988). Estudos sobre a produção de sementes em plantas isoladas ou infrutescências ensacadas de *P. hispidinervum* (Silva & Oliveira, 2000b) evidenciaram a presença de algum mecanismo biológico que evita a autofecundação. No presente trabalho, a diferença entre a taxa de cruzamento multilocos e a de locos individuais mostrou essa mesma tendência, evidenciando que existe uma preferência para cruzamento entre indivíduos não-aparentados.

A evidência de uma possível auto-incompatibilidade de *P. hispidinervum*, demonstra características biológicas particulares, pois espera-se que espécies colonizadoras apresentem um sistema de auto-compatibilidade a fim de garantir sua reprodução e rápido estabelecimento (Stebbins, 1957). Espécies colonizadoras, geralmente são alógamas, mas quase todas são auto-compatíveis (Brown & Marshall, 1981).

Conforme esperado para uma espécie preferencialmente de cruzamento, em que o acasalamento entre indivíduos aparentados é evitado, a estimativa do coeficiente de endogamia f , para a população natural de Assis Brasil, não diferiu de zero, evidenciando que não ocorre endogamia na população. Estes resultados sugerem que a espécie pode apresentar uma possível depressão por endogamia, tendo desenvolvido, evolutivamente, mecanismos biológicos para evitá-la, ou existe uma forte seleção contra progênes endogâmicas.

Na análise da diversidade genética das 13 populações estudadas não foi observado mudanças nesse comportamento da espécie, visto que os resultados de estrutura genética obtidos pelas frequências alélicas, assumindo-se equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram semelhantes aos obtidos pelos dados dominantes.

6.3 - Diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa

Os resultados de polimorfismo, de uma maneira geral, evidenciaram uma alta variabilidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa. No entanto, avaliando-se as espécies separadamente, observa-se uma baixa variabilidade genética da espécie *P. aduncum*, o que pode indicar um comportamento reprodutivo distinto, pois, provavelmente, esta seja uma espécie preferencialmente autógama, enquanto que *P. hispidinervum* é preferencialmente alógama (dados isoenzimáticos não publicados). Em um estudo sobre a ecologia da polinização de Piperaceae em mata semidecídua do Sudeste brasileiro, *P. aduncum* apresentou elevados índices de autopolinização espontânea (Figueiredo, 1997), indicando que a taxa de autofecundação nesta espécie deve ser alta, concordando com os resultados obtidos no presente trabalho. Os genótipos BAG 127 e BAG 148 apresentaram características genéticas bem diferentes dos demais, pois dos 25 marcadores RAPD analisados para esses genótipos apenas dois (OP-A5a e OP-A12c) ocorreram nas outras espécies, sendo estes os marcadores monomórficos para as três espécies.

Embora a variabilidade genética representada na coleção de germoplasma tenha sido alta, existe a necessidade de se estruturar melhor essa coleção, principalmente no que diz respeito à caracterização dos locais de coleta. Como a coleta de germoplasma foi feita logo no início dos estudos com a pimenta longa, onde eram poucos os conhecimentos sobre a biologia da espécie de interesse, foram coletados indivíduos isolados procurando-se representar o maior número possível de locais de ocorrência. No entanto, como a espécie de interesse comercial (*P. hispidinervum*) é preferencialmente alógama, a melhor estratégia de coleta de germoplasma seria por populações. Cada população deve ser caracterizada quanto à forma de ocorrência, solo, clima, etc., procurando-se obter uma associação da população com a situação de perturbação. Seria interessante, ainda, verificar como a espécie ocorre na floresta natural, sem perturbação, visando entender sua dinâmica de colonização. Almeida (1999), avaliando o banco de sementes e chuva de sementes de *P. hispidinervum*, em uma população natural, verificou

que o banco de sementes no solo é restrito, havendo reposição constante pela chuva de sementes; sendo considerada como uma espécie típica de área antropizada.

6.3.1 - Relacionamento genético entre genótipos

O dendrograma obtido pelo agrupamento das similaridades de Jaccard evidenciou três grupos distintos, os quais podem ser definidos como correspondentes às três espécies estudadas. No entanto, no grupo denominado *hispidinervum* observa-se um subgrupo formado por seis genótipos procedentes do município de Tarauacá (identificados como *P. affinis hispidinervum*), enquanto que os demais genótipos são todos procedentes de municípios do Vale do Rio Acre. Além dessa diferença de área de ocorrência, observou-se uma diferenciação nos componentes químicos do óleo, onde o teor médio de safrol encontrado para esses seis genótipos foi de 22,01%, enquanto que para os demais do grupo esse valor foi de 93,7%. Devido a esse resultado, foi feita uma análise química do óleo extraído dos genótipos procedentes de Tarauacá, a qual revelou a predominância de um terceiro componente, o salisan, distinto quimicamente tanto do safrol quanto do dilapiol.

Os resultados químicos indicam a possibilidade dessas plantas de Tarauacá serem pertencentes a uma quarta espécie, porém, analisando-se as frequências dos marcadores RAPD, observa-se que 63,3% dos marcadores que aparecem em *P. hispidinervum* também aparecem nesses genótipos de Tarauacá e, ainda, todos os marcadores considerados diagnósticos para *P. hispidinervum* apareceram em 100% dos genótipos desse subgrupo. Assim, os dados genéticos mostram que os indivíduos procedentes de Tarauacá devem pertencer à espécie *P. hispidinervum*, podendo ser considerados como um ecótipo adaptado à região dos rios Tarauacá e Envira, cujas características fitoquímicas e genéticas diferem do grupo de indivíduos de *P. hispidinervum* encontrado no vale do Rio Acre.

O agrupamento formado pelos indivíduos de *P. aduncum* se mostrou muito homogêneo, com grau de similaridade entre genótipos próximo de 1,00, indicando que para essa espécie a coleção de germoplasma não tem diversidade genética. O alto grau de monomorfismo indica a possibilidade da ocorrência de elevadas taxas de

autofecundação, pois todos os genótipos analisados são procedentes do Vale do Juruá (município vizinhos – Figura 01), podendo fazer parte de uma mesma população. Espécies autógamas apresentam pouca diferenciação genética entre indivíduos de uma mesma população, sendo que a maior parte da variabilidade genética encontra-se entre populações (Jain, 1976; Loveless & Hamrick, 1984; Linhart & Grant, 1996). Desta forma, para que a variabilidade genética de *P. aduncum* seja aumentada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, torna-se necessário a coleta de germoplasma em diferentes regiões, caracterizando-se as populações coletadas.

Quanto à *P. hispidum*, a discussão sobre o relacionamento genético dessa espécie com as demais fica prejudicada, visto que a coleção de germoplasma dispõe apenas de um genótipo classificado botanicamente como sendo dessa espécie. No entanto, observou-se que os marcadores RAPD presentes no genótipo dessa espécie foram, na sua maioria, diferentes dos observados nas demais espécies.

6.3.2 - Identificação taxonômica

Os marcadores RAPD foram capazes de diferenciar *P. hispidinervum* de *P. aduncum*, não deixando dúvidas de que são espécies distintas, pois tanto o grau de polimorfismo quanto o número de marcadores amplificados por *primer*, para cada espécie, foram bem diferentes. Inclusive, o número de marcadores comuns às duas espécies foi relativamente baixo, cerca de 13,6%.

Na Amazônia, existem mais de dez espécies de *Piper* produtoras de óleo essencial (Maia et al., 1987). No entanto, existem dúvidas quanto à caracterização botânica correta dessas espécies, principalmente quanto às que produzem safrol, pois Yuncker (1972) classifica *P. hispidinervum* como uma espécie enquanto que Calejjas (citado por Silva, 1993) classifica-a como uma variação de *P. aduncum*. Embora exista essa controvérsia, a análise química dos componentes encontrados no óleo essencial consegue distingui-las muito bem, pois *P. hispidinervum* apresenta, quase sempre, teores de safrol no óleo superiores a 80%, enquanto que no óleo extraído de *P. aduncum* este componente é quase ausente, predominando o dilapiol. Os resultados apresentados neste trabalho

servem para esclarecer essa dúvida, definindo *P. hispidinervum* e *P. aduncum* como duas espécies diferentes.

Com base nos marcadores diagnósticos, quinze dos dezesseis genótipos da coleção de germoplasma sem identificação quanto à espécie puderam ser identificados como *P. hispidinervum*. Destes quinze, nove podem ser classificados como pimenta longa típica (BAG 14, BAG 47, BAG 53, BAG 75, BAG 80, BAG 84, BAG 86, BAG 145 e BAG 147) e os seis restantes seriam representantes do ecótipo do vale dos rios Tarauacá e Envira (BAG 137, BAG 138, BAG 139, BAG 141, BAG 142 e BAG 144). Apenas um genótipo avaliado não pôde ser classificado, o BAG 148.

Embora o coeficiente de similaridade entre o BAG 148 e o BAG 127 tenha sido baixo (0,36), eles foram considerados, para as análises e discussões, como sendo do mesmo grupo taxonômico, devido à semelhança entre características morfológicas e componentes químicos presentes no óleo.

O indivíduo analisado como representante do genótipo BAG 113 (*P. aduncum*) foi o B 113.3. Os resultados de RAPD deste genótipo indicaram que se trata de *P. hispidinervum* e não de *P. aduncum*. Para confirmação desse resultado foi feita uma avaliação botânica no campo desse indivíduo, onde verifica-se que realmente se tratava de *P. hispidinervum*, indicando uma provável troca de mudas quando da implantação da coleção de germoplasma no campo.

6.4 - Implicações para uso e conservação da espécie *P. hispidinervum*

Pelo fato da pimenta longa ser uma espécie de grande interesse comercial, cuja exploração comercial ainda é recente, o conhecimento da quantidade e distribuição da diversidade genética na espécie é de extrema importância para o uso adequado e conservação do recurso natural ao longo do tempo.

O presente trabalho demonstrou que a espécie apresenta níveis de diversidade genética suficientes para sua manutenção e domesticação via programa de melhoramento, no entanto, sua distribuição se mostrou estruturada no espaço, seguindo o modelo de isolamento por distância.

A presença de locos privados a determinadas populações evidencia a importância da manutenção de populações naturais para que não haja perda de alelos e conseqüente redução do nível de variabilidade genética. Para a conservação da espécie *P. hispidinervum*, seria interessante a manutenção de várias populações. O manejo de populações naturais para fins comerciais é uma estratégia importante para a manutenção da variabilidade genética da espécie, visto que diminuirá a pressão antrópica no sentido de eliminar as plantas de pimenta longa que ocorrem como invasoras de pastagens. A coleta de germoplasma para fins de coleção ou mesmo melhoramento genético deve ser feita no maior número possível de populações naturais, evitando-se coletas em populações próximas geograficamente.

A estimativa de altas taxas de cruzamento e preferência para cruzamentos entre indivíduos não-aparentados indicam a importância da diversidade genética para a espécie, pois, provavelmente, a depressão por endogamia deve ser elevada, o que levou a espécie a desenvolver mecanismos biológicos para evitar a autofecundação. Assim, estratégias de cultivo que favorecem o aumento da endogamia devem ser evitadas.

A definição de descritores e avaliação dos mesmos deve ser uma prioridade para a Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre, pois trata-se de um recurso natural de grande importância econômica para o estado do Acre e até mesmo em nível mundial, o qual se mostra com potencial para melhoramento genético e obtenção de variedades de alto valor comercial. No entanto, esta espécie ainda é pouco estudada, necessitando maiores conhecimentos sobre sua biologia, visando, principalmente, a conservação do recurso genético. Outro aspecto de extrema urgência é a pesquisa sobre biologia floral e ecologia de polinização das espécies, visto que ainda não se sabe como controlar cruzamentos, ou quais os mecanismos que conferem a alogamia.

7. CONCLUSÕES

- A espécie *Piper hispidinervum* apresentou altos níveis de diversidade genética e uma estrutura genética espacial que se enquadra no modelo de isolamento por distância;
- A diferenciação genética entre populações dentro de regiões e entre regiões foi elevada, podendo ser explicada por um provável efeito fundador e/ou diferentes dinâmicas evolutivas das populações;
- A taxa de cruzamento estimada para a população natural de Assis Brasil foi 1,033, evidenciando que a espécie é preferencialmente de fecundação cruzada;
- Não foi evidenciado cruzamento bi-parental, sugerindo a existência de algum mecanismo biológico para evitar o cruzamento entre indivíduos aparentados ou uma distribuição espacial aleatória dos genótipos das plantas adultas;
- A diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de Pimenta Longa da Embrapa Acre foi elevada;
- Nove genótipos de pimenta longa, da coleção de germoplasma, sem identificação botânica quanto à espécie, mostraram-se semelhantes geneticamente à *Piper hispidinervum*.
- Seis genótipos procedentes de Tarauacá, denominados botanicamente por *P. affinis hispidinervum*, agruparam-se com *P. hispidinervum*, sendo considerados como ecótipos dessa espécie;
- *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. hispidum* foram bem diferentes geneticamente, sendo possível a identificação de nove marcadores diagnósticos para *P. aduncum* e quatro para *P. hispidinervum*.

- A domesticação e plantio de *P. hispidinervum* devem evitar estratégias que favoreçam a endogamia, como por exemplo plantio de indivíduos aparentados;
- Coletas de germoplasma para fins de melhoramento devem ser feitas no maior número possível de populações naturais, evitando-se populações próximas geograficamente, a fim de se amostrar o máximo da variabilidade genética existente na espécie;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAREZ, F.V.; RIZZINI, C.M. & PEREIRA, C. **Botânica:** taxonomia, morfologia e reprodução dos angiospermae: chaves para determinação das famílias. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1994. p.: 198-199.
- ALENCAR, R. Óleos essenciais de plantas brasileiras. **Acta Amazônica**, v.1, p.41-43. 1971.
- ALMEIDA, M.C. Banco de sementes e simulação de clareiras na germinação de Pimenta Longa (*Piper hispidinervum* C.DC.). Rio Branco, 1999. 60p. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal do Acre.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R. & MARTÍNEZ-RAMOS, M. Seed bank versus seed rain in the regeneration of a tropical pioneer tree. **Oecologia**, v.84, p.314-325, 1990.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R. & GARAY, A.A. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia* a tropical pioneer tree species. **Evolution**, v.48, p.437-453, 1994.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; GARCIA-BARRIOS, R.; LARA-MORENO, C. & MARTINEZ-RAMOS, M. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annu. Ver. Ecol. Syst.**, v.27, p.387-421, 1996a.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; CHAOS, A.; PIÑERO, D. & GARAY, A.A. Evolutionary consequences of patch dynamics, seed dispersal, and seed banks: demographic genetics of *Cecropia obtusifolia*, a pioneer tropical tree species. **Evolution**, v.50, p.1155-1166, 1996b.

- ANON, A. **Marketing reports in tissues of the chemical marketing reporter.** New York: Schnell publishing. 1992.
- ANYA, A.L. Study of the allelopathic activity in the essential oil of *Piper auritum*. In: Congress of essential oils, 6, 1974, Oak Park. **Proceeding ...**, Oak Park: Alhured Published Corporation. 1974.
- ARCTANDER, S. **Perfume and flavour materials of natural origin.** Elisabeth, New Jersey. 1960.
- AYRES, D.R. & RUAN, F.J. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and Allozyme techniques. **American Journal of Botany**, v.86, n.3, p.344-353, 1999.
- BARRETT, S.C.H. & KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A. & HOLSINGER, K.E. (Eds) **Genetics and conservation of rare plants.** New York: Oxford Univ. Press, 1991. p.3-30.
- BAWA, K.S. & HADLEY, M. (Eds.) **Reproductive ecology of tropical forest plants.** Paris: UNESCO, 1990.
- BAWA, K.S. Breeding system of trees in a tropical wet forest. **NZ J. Bot.**, v.17, p.521-524, 1979.
- BAWA, K.S. Breeding systems of three species of a lowland tropical community. **Evolution**, v.28, p.85-92, 1974.
- BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ABDALA, R.V.; PIMENTEL, F.A.; SOUZA, J.A. de; PEREIRA, M.V.G.; BERGTER, L. & GUIMARÃES, E.F. Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C.DC. (long pepper). No prelo.
- BLACK, W.C. IV; DUTEAU, N.M.; PUTERKA, G.J.; NECHOLS, M.J. & PETTORINI, J.M. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids (*Homoptera*, Aphididae) Bull. **Entomol. Res.**, v.82, p. 151-159, 1992.

- BOSHIER, D.H.; CHASE, M.R. & BAWA, K.S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. **Am. J. Bot.**, v.82, p.:476-483, 1995.
- BOYLE, T.; LIENGSIRI, C. & PIEWLUANG, C. Genetic structure of black spruce on two contrasting sites. **Heredity**, v.65, p.:393-399, 1990.
- BROWN, A.H. & MARSHALL, D.R. Evolutionary changes accompanying colonization in plants. In: SCUDDER, G.E.C. & REVEAL, J.L. (eds.) **Evolution today**, Hunt Institute for Botanical Documentation, Carnegie-Mellon University, Pittsburgh, PA. p. 351-363. 1981.
- BUCCI, G.; VENDRAMIN, G.G.; LELLI, L & VICARIO, F. Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. **Theor. Appl. Genet.**, v.95, p.1138-1146, 1997.
- BUDOWSKI, G. Distribution on tropical american rain forest species in the light sucessional process. **Turrialba**, v.15, n.1, p.40-42, 1965.
- CHARLESWORTH, D. & CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v.18, p.237-268, 1987.
- COELHO, A.S.G. **Bood**: Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia, GO. Lab. de Genética Vegetal, Deptº de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás. 2000.
- CRAWFORD, T.J. What is a population? In SHORROCKS, B. (ed.) **Evolutionary Ecology**. Oxford: Blackwell Sci., 1984. p.135-174.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p.86-89.
- DEMISSIE, A. **Morphological and molecular markers diversity in Ethiopian landrace barleys**: implications to in situ and ex situ conservation of landrace materials. Agricultural University of Norway, Norway, 1996. 160p.

- DENSLOW, J.S. Gap partitioning among tropical rainforest trees. **Biotropica**, v.12 supl., p.47-55, 1980.
- DIAS, L.A. dos S. & KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**, v.3, n.3, p.119-127. 1982.
- EGUIARTE, L.E.; PÉREZ-NASSER, N. & PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate, and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, v.69, p.217-228, 1992.
- EPPERSON, B.K. & ALLARD, R.W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. **Genetics**, v.121, p:369-378, 1989.
- EPPERSON, B.K. Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. **Genetics**, v.124; p.:757-771, 1990.
- EPPERSON, B.K. Fine-scale spatial structure: correlations for individual genotypes differ from those for local frequencies. **Evolution**, v.45, p.1022-1026, 1995.
- EXCOFFIER, N.C.; SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. de M. de A. Silva e J. C. Silva. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1987. 279p.
- FERGUSON, M.E.; FORD-LLOYD, B.V.; ROBERTSON, L.D.; MAXTED, N. & NEWBURY, H.J. Mapping the geographical distribution of genetic variation in the genus *Lens* for the enhanced conservation of plant diversity. **Molecular Ecology**, v.7, n.12, p.1743-1755. 1998.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, . 1996. 220p.

- FIGUEIREDO, R.A. Fenologia e ecologia da polinização de espécies de Piperaceae em mata semidecídua do sudeste brasileiro. Campinas, SP. UNICAMP, 1997. 145p. Tese (Doutorado).
- FLEMING, T.H. Fecundity, fruiting pattern and seed dispersal in *Piper amalago* (Piperaceae), a bat-dispersed tropical shrub. **Oecologia**, v.51, p.42-46, 1981.
- FLEMING, T.H. & HEITHAUS, E.R. Frugivorous bats, seed shadows, and the structure of tropical forests. **Biotropica Supplement**, v.13, p. 45-53, 1981.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M. & GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.842-849. 1997.
- GANDARA, F.B. Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP, 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências).
- GENTRY, A.W. Patterns of neotropical plant species diversity. In: HECKT, M.K.; WALLACE, B. and PRANCE, G.T. (eds.). **Evolutionary biology**, Plenum Press, New York.v.5, p.1-84, 1982.
- GRAND PAGE. **List of price of essential oil in international market**, London Pub. 1992.
- GRIFFIN, A.R. Effects of inbreeding on growth of forest trees and implications for management of seed supplies for plantation programmes. In: BAWA, K.S. & HADLEY, M. (Eds.) **Reproductive ecology of tropical forest plants**. Paris: UNESCO, p.355-374, 1990.
- HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N. AFANADOR, L. & KELLY, J.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 119, p. 122-125, 1994.

- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A. & FLEMING, T.H. (eds.) **Frugivores and seed dispersal**. Dr. Junk Publications, Dordrecht, The Netherlands, p.211-223, 1986.
- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree population: associations with reproductive biology. In: BOCK, J. & LINHART, Y.B. (Eds) **Evolutionary ecology of plants**. Boulder: Westview, p.129-146, 1989.
- HAMRICK, J.L. & MURAWSKI, D.A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. **J. Trop. Ecol.**, v.7, p.385-399, 1991.
- HAMRICK, J.L. Distribution of genetic diversity in tropical tree populations: implications for the conservation of genetic resources. In: LAMBETH, C.C. & DVORAK, W. (Eds.) **Resolving tropical forest resource concerns through tree improvement, gene conservation and domestication of new species**. N.C. State Univ. Press, p.74-82, 1994a.
- HAMRICK, J.L. Genetic diversity and conservation in tropical forest. In: DRYSDALE, M.; JOHN, S & YAPA, A.C. (eds) Proc. Int. Symp. **Genetic Conservation** Production of Tropical Forest Tree Seed. Asean-Canada Forest Tree Seed Center, p.1-9, 1994b.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A. & NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, v.107/108, p.281-297, 1993.
- HAMRICK, J.L. Distribution of genetic diversity within and among natural forest population. In: CHAMBERS, S.M.; MACBIDE, B. & THOMAS, W.L. (Eds.) **Shonewald-cox**. 1982.
- HEYWOOD, J.S. & FLEMING, T.H. Patterns of allozyme variation in three Costa Rican Species of *Piper*. **Biotropica**, v.18, n.3, p.208-213, 1986.

- HUFF, D.R.; PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. **Theor. Appl. Genet.**, v.86, p.927-934, 1993.
- ISABEL, N.; BEAULIEU, J. & BOUSQUET, J. Complete congruence between gene diversity estimatives derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.6369-6373, 1995.
- JÄGGI, C.; WIRTH, T. & BAUR, B. Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for a conservation strategy. **Biological Conservation**, v.94, p.69-77, 2000.
- JAIN, S.K. The evolution of inbreeding in plants. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v.7, p.469-495, 1976.
- JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional. p.308-310, 1993.
- KAGEYAMA, P.Y. & GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ACIESP, 1994. V2, p.1-7.
- KAGEYAMA, P.Y.; FREIXÊDAS, V.M.; GERES, W.L.A.; DIAS, J.H.P. & BORGES, A.S. Consórcio de espécies nativas de diferentes grupos sucessionais em Teodoro Sampaio-SP. **Revista do Instituto Florestal**, v.4, único, p.527-533, 1992a. Edição Especial.
- KAGEYAMA, P.Y.; REIS, A. & CARPANEZZI, A.A. Potencialidades e restrições da regeneração artificial na recuperação de áreas degradadas. In: Anais do Simpósio Nacional sobre Áreas Degradadas. Curitiba, PR, UFPR-FUPEF. p. 1-7, 1992b.
- KAWAGUICI, C.B. Variação genética em três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae), em Mata de Galeria.

- Piracicaba, 1999. 98p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- KEYS, R.N. & SMITH, S.E. Mating system parameters and population genetic structure in pionner populations of *Prosopis velutina* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.81, n.8, p.1013-1020, 1994.
- KIMURA, M. & WEISS, G.H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v.49, p.561-576, 1964.
- KIRSTEN, J.H.; DAWES, C.J. & COCHRANE, B.J. Randomly amplified polymorphism detection (RAPD) reveals high genetic diversity in *Thalassia testudinum* banks ex König (Turtlegrass). **Aquatic botany**, v.61, p.269-287, 1998.
- KNOWLES, P. Genetic variability among and within closely spaced populations of lodgepole pine. **Can. J. Genet. Cytol.**, v.26, p.:177-184, 1984.
- KNOWLES, P. Spatial genetic structure within two natural stands of black spruce [*Picea mariana*(Mill.) B.S.P.]. **Silvae Genetica**, v.40, p.:13-19. 1991.
- LE CORRE, V.; DUMOLIN-LAPÈGUE, S. & KREMER, A. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. **Mol. Ecol.**, v.5, p.519-529, 1997.
- LINHART, Y.B.; MITTON, J.B.; STURGEON, K.B. & DAVIS, M.L. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. **Heredity**, v.46, p.:407-426, 1981.
- LINHART, Y.B. & GRANT, M.C. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v.27, p.237-277, 1996.
- LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** v.15, p.65-95, 1984.
- LYNCH, M. & MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v.3, p.:91-99, 1994.

- MAIA, J.G.S.; SILVA, M.I. da & LUZ, A.I.R. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, São Paulo, v.10, n.3, 0.200-204. 1987.
- MARIOT, A. Distribuição da diversidade genética e aspecto da fenologia e dispersão de sementes da pariparoba (*Piper cernun*). Florianópolis: Centro de Ciências Agrárias, UFSC, 2000. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências)
- MARQUIS, R.J. Phenological variation in the neotropical understory shrub *Piper arieianum*: causes and consequences. **Ecology**, v.69, p.1552-1565, 1988.
- MARTIN, F.W. & GREGORY, L.E. Mode of pollination and factors effecting fruit set in *Piper nigrum* L. in Puerto Rico. **Crop Science**, v.2, p.295-299, 1962.
- McNEELY, J.A. MILLER, K.R.; REID, W.V.; MITTERMEIER, R.A. & WERNER, T.B. **Conserving the world's biological diversity**. Gland: IUCN, 1990. 193p.
- MOFFETT, A.A. & NIXON, K.M. The effects of self-fertilization on green wattle (*Acacia decurrens*) and black wattle (*Acacia mearnsii*). **Wattle Res. Inst. Rep.** v.1973/1974, p.66-84. 1974.
- MORAES, M.L.T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de *Myracrodouon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão - ANACARDIACEAE (Syn: *Astronium urundeuva* FR Allemão Engle). Piracicaba, 1993. 153p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroa", Universidade de São Paulo.
- MORAN, G.F.; MUONA, O. & BELL, J.C. Breeding system and genetic diversity in *Acacia auriculiformis* and *Acacia crassicarpa*. **Biotropica**, v.21, p.250-256. 1989.
- MURAWSKI, D.A.; GUNATILLEKE, I.A.U.N. & BAWA, K.S. The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. **Conserv. Biol.**, v.8, p.997-1002. 1994.
- MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v.67, p.167-174. 1991.

- NASON, J.L.; ALDRICH, P.R. & HAMRICK, J.L. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In: LAURANCE, W.F. (Ed.). **Tropical forest Remnants**. In press, 1996. p.304-320.
- NEBAUER, S.G.; CASTILLO-AGUDO, L. del & SEGURA, J. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v.98, p.985-994, 1999.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **Am. Nat.**, v.106, p.283-292, 1972.
- NEI, M.; MARUYAMA, T. & CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v.29, p.1-10, 1975.
- NICOTRA, A.B.; CHAZDON, R.L. & SCHLICHTING, C.D. Patterns of genotypic variation and phenotypic plasticity of light response in two tropical *piper* (Piperaceae) species. **Am. J. Bot.**, v.84, p.1542-1552. 1997.
- NUNNEY, L. & CAMPBELL, K.A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. **Trends Ecol. Evol.**, v.8, p.234-243. 1993.
- OLIVEIRA, M.M. & LUNZ, A.M.P. Coleta, conservação, caracterização e avaliação de genótipos de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) no estado do Acre. Rio Branco: EMBRAPA, 1996. 4p. (Pesquisa em Andamento, 86).
- O'MALLEY, D.M. & BAWA, K.S. Mating system of a tropical rain forest tree species. **Am. J. Bot.**, v.74, p.1143-1149. 1987.
- O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T. & BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*: Lecythidaceae). 2. Mating system. **Theor. Appl. Genet.**, v.76, p.929-932. 1988.
- PIMENTEL, F.A. & PINHEIRO, P.S.N. Mapeamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) no município de Brasília. Rio Branco: EMBRAPA – CPAF/AC, 2000. 20p. (Embrapa – CPAF/AC. Boletim de Pesquisa, 28).

- PIMENTEL, F.A.; PEREIRA, J.B.M. & OLIVEIRA, M.N de. Zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Acre. Rio Branco: EMBRAPA – CPAF/AC, 1998. 17p (Embrapa – CPAF/AC. Boletim de Pesquisa, 20).
- PENTEADO, M.I.O; GARCIA, P. & PEREZ de la VEGA, M. Genetic variability and mating system in three species of the genus *Centrosema*. **Journal of Heredity**, v.87, n.2, p.124-130. 1996.
- PERECIN, M.B. Diversidade genética em populações naturais de espécies de Espinheira-Santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. Piracicaba: Departamento de Genética, ESALQ/USP, 2000. 134p. Tese (Doutorado em Agronomia).
- PERRY, D.J. & KNOWLES, P. Spatial genetic structure within three sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) stands. **Heredity**, v.66, p.:137-142, 1990.
- PRAKASH, N; BROWN, J.F. & YEU-HUA, W. Na embryological study of kava, *Piper methysticum*. **Aust. J. Bot.**, v.42, p.231-237, 1994.
- RAHAMAN, M; HOSSAIN, M & DAS, N.D. Genetic divergence in betelvine (*Piper betle* L.). **J. Plant. Crops.**, v.25, p.57-61. 1997.
- ROCHA, S.F.R. & MING, L.C. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole. P.479-481. In: J. Janick (ed.), **Perspectives on new crops and new uses**. ASHS Press, Alexandria, VA.1999.
- RITLAND, K. & JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using “n” independent loci. **Heredity**, v.47, n.1, p.35-52. 1981.
- RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **J. Heredity**, v.82, p.235-237. 1990.
- SALDARRIAGA, J.G. Recuperação de la diversidad y estructura de la selva. In: SALDARRIAGA, J.G. **Recuperação de la selva de tierra firme en el alto Rio**

- Negro Amazônia colombiana-venezolana.** Bogotá: Tropenbos, 1994. V.5, p.65-93.
- SANTIAGO, E.J.A. Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) em condições “in vitro” e “in vivo”. Lavras, 1999. 118p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Lavras.
- SAWAZAKI, H.E.; NAGAI, H. & SODEK, L. Caracterização da variabilidade genética em couve-manteiga utilizando isoenzimas e RAPD. **Bragantia**, v.56, n.1, p.9-19. 1997.
- SEFC, K.M.; REGNER, F.; GLOSSL, J. & STEINKELLNER, H. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. **Vitis**, v.37, n1, p.15-20. 1998.
- SENGUPTA, S. & RAY, A.B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v.58, p.147-166, 1987.
- SILVA, M.H.L. Tecnologia de cultivo e produção racional de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.). taguai, 1993. 87p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- SILVA, A.C.P.R.da & OLIVEIRA, M.N.de. Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000a. 13p. (Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa, 23).
- SILVA, A.C.P.R.da & OLIVEIRA, M.N.de. Produção e dispersão de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*). Rio Branco: Embrapa Acre, 2000b. 14p. (Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa, 24).
- SILVERTOWN, J.W. & DOUST, J.L. **Introduction to plant population biology.** Oxford: Blackwell Sci. 1993. 210p.
- SLATKIN, M. & ARTER, H.E. Spatial autocorrelation methods in population genetics. **Am. Nat.**, 138, p.:499-517, 1991.

- SLATKIN, M. & BARTON, N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v.43, p.1349-1368. 1989.
- SLATKIN, M. Gene flow and geographic structure of nature populations. **Science**, v.236, p.787-792, 1987.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v.16, p.393-430. 1985.
- SOKAL, R.R & ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology. 1. Methodology. **Biol. J. Lin. Soc.**, v.10, p.:199-228, 1978.
- SOUSA, M.M.M. Influência da densidade de plantio sobre o crescimento de plantas de pimenta longa (*Piper hispidinervium*). Rio Branco: EMBRAPA, 1997, 4p. (Pesquisa em Andamento, 93).
- STEBBINS, G. Self fertilization and population variability in the higher plants. **Am. Nat.**, v.91, p. 337-354, 1957.
- TYLER, V.E.; BRADY, L.R. & ROBBERS, J.E. **Pharmacognosy**. 9th ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 1982.
- VAN DEN BERG, M.E. **Plantas medicinais da Amazônia, contribuição ao seu conhecimento sistemático**, Brasília, DF – PTU, 1983. 123p.
- WAGNER, D.B.; SUN, Z.; GOVINDARAJU, D.R. & DANCİK, B.P. Spatial patterns of chloroplast DNA and cone morphology variation within populations of a *Pinus banksiana-Pinus contorta* sympatric region. **Am. Nat.**, v.138, p.:156-170, 1991.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. **Evolution**, v.38, n.6, p.1358-1370, 1984.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218. 1990.
- WHITMORE, T.C. Gaps in the forest canopy. In: TOMLINSON, P.B. e ZIMMERMANN, M.H. (eds.). **Tropical trees as living systems**. Cambridge: University Press, 1978. p.639-55.

- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.
- WRIGHT, S. Breeding structure fo populations in relation to speciation. **American Naturalist**, v.74, p.232-248, 1940.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, p. 114-138, 1943.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugenics** v.15, p.323-354, 1951.
- WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**: the theory of gene frequencies. Chicago: Univ. Chicago Press, 1969.
- WU, J; KRUTOVSKII, K.V. & STRAUSS, S.H. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationship in the California closed-cone pines basead on RAPD and allozyme markers. **Genome**, v.42, p.893-908, 1999.
- YUNCKER, T.G. **The Piperaceae of Brazil**. Hoehnea, v.2, São Paulo. 1972.

ANEXOS

Anexo I - Presença de marcadores RAPD em cada população natural de pimenta longa amostrada no Vale do Acre.

| Pop. Alto Acre | | | | | | Pop. Baixo Acre | | | | | | |
|----------------|----|----|----|----|----|-----------------|----|----|----|----|----|----|
| 2 | 6 | 5 | 4 | 3 | 13 | 12 | 8 | 9 | 11 | 10 | 7 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 23 | 15 | 23 | 20 | 22 | 23 | 20 | 23 | 23 | 18 | 22 | 21 |
| 4 | 1 | 3 | 2 | 9 | 14 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 14 | 6 | 13 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 11 | 12 | 10 | 13 | 6 | 4 | 0 | 2 | 1 | 9 | 1 | 7 |
| 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 22 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 19 | 17 | 18 | 17 | 13 | 20 |
| 23 | 22 | 19 | 17 | 20 | 16 | 16 | 20 | 20 | 21 | 19 | 22 | 23 |
| 16 | 17 | 16 | 19 | 17 | 22 | 22 | 19 | 17 | 13 | 12 | 23 | 22 |
| 21 | 21 | 16 | 19 | 13 | 19 | 22 | 20 | 18 | 22 | 22 | 11 | 21 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 23 | 23 | 21 | 23 | 23 | 23 | 23 | 20 | 23 | 15 | 0 | 19 | 0 |
| 0 | 17 | 17 | 23 | 20 | 11 | 4 | 3 | 8 | 6 | 4 | 7 | 4 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 17 | 22 | 22 | 22 | 22 | 7 | 7 | 6 | 8 | 10 | 12 | 6 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 22 | 23 | 23 |
| 23 | 23 | 21 | 23 | 21 | 23 | 22 | 23 | 23 | 22 | 17 | 18 | 20 |
| 23 | 23 | 22 | 20 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 21 | 22 | 23 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 20 | 23 |
| 23 | 23 | 21 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 23 | 23 | 21 | 23 | 23 | 23 | 23 | 12 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 6 | 2 | 0 | 8 |
| 19 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 22 | 23 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 9 | 5 | 16 | 2 | 8 | 12 | 0 | 1 | 0 | 1 | 4 | 1 | 5 |
| 19 | 12 | 19 | 21 | 21 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 22 | 23 | 23 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 21 | 19 | 22 | 20 | 23 | 20 | 23 |
| 23 | 19 | 17 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 13 | 22 | 20 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 6 | 3 | 4 | 13 | 16 | 4 |
| 0 | 0 | 7 | 0 | 13 | 11 | 6 | 7 | 5 | 13 | 5 | 4 | 2 |
| 10 | 13 | 4 | 15 | 8 | 12 | 11 | 11 | 11 | 23 | 9 | 1 | 11 |
| 12 | 23 | 12 | 16 | 8 | 10 | 6 | 11 | 14 | 14 | 2 | 20 | 13 |

continua

Anexo I - Presença de marcadores RAPD em cada população natural de pimenta longa amostrada no Vale do Acre (continuação).

| Pop. Alto Acre | | | | | | Pop. Baixo Acre | | | | | | |
|----------------|----|----|----|----|----|-----------------|----|----|----|----|----|----|
| 2 | 6 | 5 | 4 | 3 | 13 | 12 | 8 | 9 | 11 | 10 | 7 | 1 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 4 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 14 | 11 | 10 | 21 | 9 | 9 | 8 | 6 | 0 | 2 | 5 | 14 | 1 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 4 | 4 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 2 | 8 | 3 | 8 | 0 | 5 |
| 0 | 1 | 3 | 0 | 2 | 0 | 9 | 4 | 10 | 11 | 7 | 4 | 13 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| 23 | 23 | 22 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 19 | 23 | 23 |
| 10 | 14 | 11 | 18 | 20 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |

Anexo II - Genótipos de Pimenta Longa amostrados na População natural de Assis Brasil-AC, estimados a partir da análise de 16 locos RAPD avaliados nas progênes e plantas-mãe.

| Indivíduo | Loco RAPD | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 15 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 |
| 1 | 12 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 11 | 12 | 22 | 22 | 11 | 22 | 12 | 22 |
| 2 | 11 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 12 | 22 |
| 3 | 11 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 22 | 12 | 12 | 12 | 22 |
| 4 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 11 | 22 |
| 5 | 12 | 22 | 11 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 11 | 22 | 22 |
| 6 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 11 | 22 | 12 | 12 | 22 |
| 7 | 12 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 11 | 22 | 11 | 22 |
| 8 | 12 | 22 | 11 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| 9 | 12 | 12 | 11 | 22 | 11 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 11 | 22 | 12 | 22 |
| 10 | 12 | 12 | 11 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 12 | 12 | 22 |
| 11 | 12 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 12 | 22 | 12 | 12 | 22 |
| 12 | 11 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 22 |
| 13 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 12 | 22 |
| 14 | 22 | 11 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 12 | 11 | 22 | 12 | 22 |
| 15 | 22 | 12 | 12 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 22 | 12 | 22 | 12 | 12 | 22 |
| 16 | 22 | 12 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 11 | 22 | 12 | 22 |
| 17 | 11 | 12 | 11 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 |
| 18 | 12 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 11 | 12 | 12 | 22 |
| 19 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 12 | 22 | 11 | 22 | 12 | 22 |
| 20 | 12 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 11 | 22 | 11 | 22 |
| 21 | 12 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 11 | 22 | 11 | 22 | 12 | 22 |
| 23 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 11 | 12 | 12 | 22 |
| 24 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 12 | 22 | 12 | 11 | 22 | 12 | 22 |
| 25 | 11 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 12 | 22 |